

Aus dem
Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

***In-ovo*-Geschlechtsbestimmung bei Legehybriden mittels
endokriner Analyse der Allantoisflüssigkeit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anne Weißmann
aus Nienburg (Weser)

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Almuth Einspanier

Gutachter: Prof. Dr. Almuth Einspanier

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Martin Wähner

Fachbereich Landwirtschaft, Ökotropologie und Landschaftsentwicklung
der Hochschule Anhalt (FH) Bernburg

Tag der Verteidigung: 06. Mai 2014

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Legehennen	3
2.2	Bildung und Aufbau des Hühnereies	4
2.3	Embryonale Entwicklung des Huhnes	5
2.3.1	Embryonale Exkretion	6
2.3.2	Gonaden und endokrines System	7
2.3.3	Phasen der Embryonalentwicklung	9
2.3.4	Embryonales Schmerzempfinden	11
2.4	Geschlechtsbestimmung bei Eintagsküken von Legehybriden	12
2.4.1	Kloakensexen	12
2.4.2	Federsexen	13
2.5	Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien	14
2.6	Alternativen zur Tötung männlicher Eintagsküken	15
2.6.1	Zucht	15
2.6.1.1	Zweinutzungshuhn	16
2.6.1.2	Aufzucht männlicher Legehybriden	16
2.6.2	<i>In-ovo</i> -Geschlechtsbestimmung	17
2.6.2.1	Nicht bebrütetes Hühnerei	18
2.6.2.2	Bebrütetes Hühnerei	20
2.6.2.2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.6.2.2.2	Endokrinologische Methoden	22
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Publikation 1: Sexing domestic chicken before hatch: A new method for <i>in ovo</i> gender identification	24
3.2	Publikation 2: <i>In ovo</i>-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance	32

INHALTSVERZEICHNIS

4	DISKUSSION	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	SUMMARY	60
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	ANHANG	I
8.1	Weitere Publikationen	I
8.2	Manuskript zu einem Vortrag auf der 19. Internationalen DVG Fachtagung zum Thema Tierschutz „Theorie und Praxis zum Vollzug des Tierschutzgesetzes“ am 20.-21. Februar 2014 in München	II
	DANKSAGUNG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMH	Anti-Müller-Hormon
ASW	Avian Sex-specific W-linked-Gen
B	Sperberfaktor: dominantes Allel (Sperberung)
b	Sperberfaktor: rezessives Allel (Nichtsperberung)
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Chorioallantoismembran
CHD-1	Chromobox-Helicase-DNA-Bindungsprotein-1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMRT-1	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₁	Östron
E ₂	17β-Östradiol
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzymimmunoassay
ER	Östrogenrezeptor
E ₁ S	Östronsulfat
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
FET-1	Female-Expressed-Transcript 1-Gen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
IASP	International Association for the Study of Pain
i. d. R.	in der Regel
K	Allel für langsame Befiederung (dominant)
k	Allel für schnelle Befiederung (rezessiv)
kg	Kilogramm
LB	Lohmann Brown
LBT	Landestierschutzbeauftragte Hessen
LH	Luteinisierendes Hormon

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LSL	Lohmann Selected Leghorn
min.	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MUNLV NRW	Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NI MELV	Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
O ₂	Sauerstoff
OCT	optische Kohärenztomographie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
RIA	Radioimmunoassay
S	Silberfaktor: dominantes Allel (Silberfärbung)
s	Silberfaktor: rezessives Allel (Goldfärbung)
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchlV	Tierschutzschlachtverordnung
u. a.	unter anderem
vs.	versus (im Vergleich zu)
W	weibliches Geschlechtschromosom
Xho-1	W-Chromosom-spezifische DNA-Wiederholungssequenz
Z	männliches Geschlechtschromosom
z. B.	zum Beispiel
°	Grad
°C	Grad Celsius
>	größer als
<	kleiner als
%	Prozent

1 EINLEITUNG

In Deutschland wurden im Jahr 2012 ca. 46 Millionen weibliche Legehennen erzeugt (BMELV 2013b). Obwohl nicht zwangsläufig ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis vorausgesetzt werden kann (ALONSO-ALVAREZ 2006, NAVARA 2013), ist davon auszugehen, dass in demselben Zeitraum weit über 40 Millionen männliche Küken aus Legelinien geschlüpft sind. Aus wirtschaftlichen Gründen gibt es für die männlichen Geschwisterküken der Legehennen in der industriellen Geflügelfleischproduktion keine Verwendung; daher werden sie direkt nach dem Schlupf getötet (ELLENDORFF und KLEIN 2003, KALETA und REDMANN 2008). Dies ist derzeit nach Tierschutzschlachtverordnung gestattet (ANON. 2012). Innerhalb der nächsten Jahre sind jedoch bezüglich dieses Sachverhaltes von Seiten der Gesetzgebung Änderungen zu erwarten. So hat das niedersächsische Ministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz bereits 2011 den „Tierschutzplan Niedersachsen“ beschlossen, dessen Ziel es u.a. ist, auf das Töten männlicher Eintagsküken aus Legelinien zu verzichten (NI MELV 2011, 2014). Weiterhin ist Ende 2013 in Nordrhein-Westfalen durch die dortige Landesregierung das Töten männlicher Eintagsküken nach einer Übergangsfrist ab 01.01.2015 gänzlich untersagt worden (MUNLV NRW 2013). Grund für diese Entwicklungen sind die in den letzten Jahren immer stärker werdenden ethischen und tierschutzrechtlichen Bedenken der Bevölkerung, gesunde Tiere aus ökonomischen Gründen zu töten (IDEL 2007).

Verschiedene Lösungsansätze zur Vermeidung der Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien sind in den letzten Jahren erprobt worden. Hierzu gehören die Verwendung von Zweinutzungsrasen (ICKEN et al. 2013) sowie die Aufzucht männlicher Geschwisterküken unter verschiedenen Haltungsbedingungen und Mastlängen (DAMME und RISTIC 2003, KAUFMANN und ANDERSSON 2013, KOENIG et al. 2012, LICHOVNÍKOVÁ et al. 2009, SCHAEUBLIN 2005). Aus ökonomischen und ökologischen Gründen ist bislang jedoch keiner dieser Ansätze flächendeckend realisiert worden.

Eine Alternative bietet die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung und damit das Aussortieren männlicher Embryonen noch vor dem Schlupf. Hierbei kann entweder vor Beginn oder während der Bebrütung das Geschlecht bestimmt werden. Am nicht bebrüteten Ei können geschlechtsspezifische Unterschiede im DNA-Gehalt der Keimscheibe mithilfe von optischen bzw. spektroskopischen sowie molekularbiologischen Methoden detektiert werden (STEINER et al. 2011, TIERSCH 2003). Für bebrütete Eier sind molekularbiologische (DUTTON und TIEBER 2001, JENSEN et al. 2011) sowie endokrinologische Verfahren (PHELPS et al. 2003, TRAN et al. 2010) zur Geschlechtsbestimmung von Hühnerembryonen beschrieben. Hierbei wird

minimalinvasiv embryonales Zellmaterial oder extraembryonale Flüssigkeit entnommen und anschließend auf geschlechtsspezifische Marker bzw. Hormone untersucht.

Um eine *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung in industriellen Brütereien umzusetzen, muss die verwendete Methodik verschiedenen Kriterien entsprechen. Hierzu gehören: hohe Genauigkeit der Geschlechtsidentifizierung, niedrige Stückkosten, unveränderte embryonale Vitalität sowie eine möglichst unbeeinträchtigte Produktionsleistung der adulten Hühner (KALETA und REDMANN 2008). Im Hinblick auf ethische und tierschutzrechtliche Aspekte sollte das Sexen außerdem vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens stattfinden. Aufgrund der neuronalen Entwicklung ist davon auszugehen, dass dieses bei Hühnerembryonen ab Tag 10+12 h der Inkubation der Fall ist (CLOSE et al. 1997). Keine der derzeit bekannten Techniken zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn kann sämtliche dieser Kriterien erfüllen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine verlässliche und praktikable Methode zur endokrinen *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei vor Tag 10+12 h der Embryogenese zu entwickeln. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Analyse von Geschlechtshormonen in der Allantoisflüssigkeit gelegt.

Die Studie gliedert sich in zwei Arbeitsabschnitte, deren Ergebnisse in Fachpublikationen veröffentlicht wurden. Thema der ersten Veröffentlichung (WEISSMANN et al. 2013) ist die Etablierung und Validierung geeigneter Hormonmarker für die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung. Des Weiteren sind verschiedene Methoden und Zeitpunkte für die Entnahme von Allantoisflüssigkeit getestet worden. Hierbei sollte eine verlässliche Geschlechtsbestimmung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Inkubation ermöglicht werden, welche keinen oder nur einen geringen negativen Einfluss auf die Vitalität der Embryonen hat.

In der zweiten Publikation (WEISSMANN et al. 2014a) wurde die zuvor an einem geringeren Probenumfang etablierte Methode mit größeren Stückzahlen unter Praxisbedingungen in einer industriellen Brüterei überprüft. Um einen möglichen Einfluss der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung auf den Schlupferfolg, die Mortalität sowie verschiedene Leistungsparameter der adulten Hennen auszuschließen, wurden zusätzlich Aufzucht- und Leistungsdaten der Hennen über einen Zeitraum von 33 Wochen dokumentiert.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Legehennen

Insgesamt werden in Deutschland ca. 40 Millionen Legehennen gehalten. Dies geschieht vorwiegend unter konventionellen Haltungsbedingungen (Bodenhaltung: 64,0 %, Kleingruppenhaltung: 13,2 %, Freilandhaltung: 14,6 %). Die ökologische Erzeugung hat bezogen auf die Haltungsplätze einen Marktanteil von 8,2 % (BMELV 2013a).

Die von den Legehennen produzierten Eier stellen eine wichtige Proteinquelle für die menschliche und tierische Ernährung mit hoher biologischer Wertigkeit dar. Der seit den 1950er Jahren deutlich gestiegene Bedarf an Eiern konnte nur durch Umstrukturierungen in der Wirtschaft sowie durch Anpassung von Haltungs- und Zuchtbedingungen gedeckt werden. Insbesondere durch die den heutigen Weltmarkt dominierenden und global agierenden Zuchtunternehmen wird die Rationalisierung sowie Optimierung des gesamten Produktionsprozesses vorangetrieben. Die in den 1930er Jahren entwickelte Hybridzucht hat in den vergangenen Jahrzehnten zur Erzeugung von hochspezialisierten Legehybriden geführt (SIEGMANN et al. 2005). Wie erfolgreich die leistungsorientierte Zucht der Legehennenproduzenten ist, spiegelt sich unter anderem in der Legeleistung der Tiere wieder. So konnte die durchschnittliche Legeleistung pro Henne von 210 Eiern im Jahr 1960 bis auf 312 Eier im Jahr 2010 gesteigert werden (BMELV 2012, SCHOLTYSSSEK 1987). Dadurch wird derzeit in Deutschland bei einem Eiverbrauch pro Kopf von 217 Stück pro Jahr ein Selbstversorgungsgrad von 71,7 % erreicht (BMELV 2013a).

Grundsätzlich werden Legehybriden nach der Farbe der von ihnen gelegten Eier in sogenannte Braunleger und Weißleger eingeteilt. Die zur Eierproduktion verwendeten Linien richten sich nach der vom Verbraucher präferierten Eischalenfarbe und sind somit regional unterschiedlich. In Gesamteuropa dominieren die Braunlegehybride, wobei in Deutschland ungefähr gleich viele weiß- wie braunschalige Eier verkauft werden (ARTHUR und O'SULLIVAN 2005). Beispiele für kommerzielle Braunleger sind Isa Brown (ISA Hendrix Genetics, Niederlande), Hy-Line Brown (Hy-Line International, USA) und Lohmann Brown (Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland). Je nach Herkunft unterscheiden sich die Leistungsparameter der einzelnen Linien geringfügig. Generell gehören sie mit Gewichten zwischen 1400-1600 g in Lebenswoche 18-20 (Beginn der Legeperiode) und ca. 1900-2100 g gegen Ende der Produktionsperiode (Lebenswoche 70-90) zu den mittelschweren Linien. Die Futtermittelverwertung liegt bei ca. 2 kg/kg Eimasse; das durchschnittliche Eigewicht wird mit 62-65 g angegeben (HY-LINE

INTERNATIONAL 2012a, ISA - A HENDRIX GENETICS COMPANY 2011a, LOHMANN TIERZUCHT GMBH 2013a). Weißlegende Hybride gehören hingegen zu den leichten Linien. Hier werden unter anderem die Legehybriden Isa White (ISA Hendrix Genetics, Niederlande), Hy-Line W36 (Hy-Line International, USA) und Lohmann Selected Leghorn (Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland) kommerziell verwendet. Zu Beginn der Legeperiode beträgt ihr Körpergewicht 1200-1400g, gegen Ende der Produktionsperiode 1700-1900g. Die Futterverwertung ist mit ca. 1,8-2 kg/kg Eimasse im Vergleich zu braunen Legelinien leicht erhöht, das Eigewicht mit durchschnittlich 61-63g dagegen etwas leichter (HY-LINE INTERNATIONAL 2012b, ISA - A HENDRIX GENETICS COMPANY 2011b, LOHMANN TIERZUCHT GMBH 2013b).

2.2 Bildung und Aufbau des Hühnereies

Schon im frühen Embryonalstadium entstehen im Ovar durch mehrere mitotische Teilungen der eingewanderten Primordialkeimzellen einige Millionen Oogonien. Von diesen bilden sich jedoch zum Zeitpunkt des Schlupfes über 90% wieder zurück. Die verbleibenden Oogonien treten nach dem Ende der Teilungsphase in die Prophase der Meiose 1 ein und werden somit zu Oozyten; die Fortsetzung der Reifeteilung findet erst kurz vor der Ovulation statt und wird durch den präovulatorischen Anstieg des Luteinisierenden Hormons (LH) ausgelöst. Etwa drei bis vier Tage nach dem Schlupf entstehen durch Anlagerung von Follikelepithelzellen um die Oozyten die sogenannten Primordialfollikel. Es folgt eine Phase langsamen (Dauer: Monate bis Jahre) und gesteigerten Wachstums (mehrere Monate) mit Ausdifferenzierung der Follikelwand. Im Alter von ca. 150 Tagen setzt beim Haushuhn die Legetätigkeit ein. Während der Legeperiode wird ca. alle 24h ein Follikel selektiert. Dieser tritt daraufhin in eine ein bis zwei Wochen andauernde Phase schnellen Wachstums ein, an deren Ende er i.d.R. als sprungreifer dominanter Follikel ovuliert (RÜSSE und SINOWATZ 1998, WHITTOW 2000).

Beim Huhn ist die Eibildung ein mehrstufiger Prozess, der von Ovulation bis Eiablage ca. 24h benötigt (SIEGMANN et al. 2005). Die Ovulation wird durch einen Anstieg des in der Hypophyse gebildeten LH induziert. Die Ausschüttung von LH ist tageszeitlich an das Lichtregime gekoppelt; der ovulationsauslösende LH-Anstieg findet i.d.R. ca. 10h nach Beginn der Dunkelperiode statt (CUNNINGHAM et al. 1984). Für die Steuerung der LH-Sekretion sind ovarielle Steroide von großer Bedeutung. Das in den Theka-Zellen gebildete 17 β -Östradiol (E₂) sensibilisiert die Hypophyse für das hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und stimuliert die Bildung von Progesteronrezeptoren im Hypothalamus. Dadurch kann das in den follikulären

Granulosa-Zellen synthetisierte Progesteron im Hypothalamus die Ausschüttung von GnRH anregen, welches wiederum für die LH-Sekretion der Hypophyse verantwortlich ist (CUNNINGHAM et al. 1984, HUANG et al. 1979, KATZ et al. 1990). Unter Einfluss des LH kommt es im Bereich des Stigmas, einem gefäßarmen Teil der Follikelwand, zum Platzen des reifen Follikels. Infolgedessen wird die aus Dotter und Keimscheibe bestehende Eizelle ausgestoßen und ovuliert (SALOMON 1993).

Nach der Ovulation gelangt die Eizelle in das aus Infundibulum, Magnum, Isthmus, Uterus und Vagina zusammengesetzte Ovidukt. Im Infundibulum findet innerhalb von 15-20 min. die 2. Reifeteilung und Befruchtung der Eizelle statt. Des Weiteren werden durch die Propriadrüsen die mittlere und äußere Dottermembran sowie die Vorstufen der Hagelschnüre gebildet. Im Anschluss werden im Magnum innerhalb von drei Stunden ca. 90% der Proteine des Albumens (u.a. Ovalbumin, Ovotransferrin, Ovomukoid und Lysozym) und Mineralstoffe wie Natrium, Kalium und Magnesium sezerniert. Die Bildung der Hagelschnüre wird vollendet. Im folgenden Isthmus (Verweildauer des Eies ca. 75 min.) erfolgt die Absonderung der letzten 10% des Albumens. Durch die Isthmusdrüsen werden schwefelhaltige Proteine und Kollagenfasern synthetisiert, aus denen sich die innere und äußere Schalenhaut bildet. Des Weiteren nimmt das Ei in dieser Phase Wasser auf, wodurch die spätere Eiform bestimmt wird. Gegen Ende des Isthmus beginnt die Bildung des organischen Anteils der Eischale, der Mamillenschicht. Das Ei wandert nun in den Uterus, in welchem es mit 20-21 h am längsten verweilt. Dort findet die Bildung der Kalkschale statt, welche im Anschluss mit der von den Uterindrüsen sezernierten Kutikula überzogen wird. Die Eibildung ist damit beendet; nach einer nur wenige Sekunden dauernden Passage von Vagina und Kloake wird das Ei gelegt (HUMMEL 2000).

2.3 Embryonale Entwicklung des Huhnes

Die reguläre Brutdauer beträgt bei Hühnern 21 Tage. In dieser Zeit entwickelt sich im Normalfall aus einem befruchteten Ei ein schlupffähiges Küken.

Die ersten Zellteilungen der befruchteten Keimscheibe finden noch während der Eileiterpassage statt. Zum Zeitpunkt der Eiablage besitzt der Embryo bereits 32.000-42.000 Zellen; die Furchung ist nahezu beendet (BELLAIRS und OSMOND 1998, RÜSSE und SINOWATZ 1998). Nach dem Legen tritt vorübergehend ein Entwicklungsstillstand ein; bei Temperaturen über ca. 21°C wird die Embryonalentwicklung fortgesetzt (FASENKO 2007).

Im Anschluss an die Furchung findet die Ausbildung der Keimblätter statt. In diesem als Delamination bezeichneten Vorgang bilden sich das äußere Ektoderm und das innere Entoderm, welche durch einen flüssigkeitsgefüllten Raum (Blastocoel) voneinander getrennt sind. In das Blastocoel eingewanderte ektodermale Zellen bilden sekundär das Mesoderm. Die Keimscheibe selbst ist durch die Subgerminalhöhle von dem Dotter getrennt. Wie bei allen triploblastischen Tieren bilden sich aus dem Ektoderm Haut und Nervensystem, aus dem Mesoderm u. a. Muskeln, Skelett, Gefäßsystem, Geschlechtstrakt sowie Nieren und aus dem Entoderm u. a. große Anteile des Verdauungstraktes, Leber und Atmungstrakt (SALOMON 1993, SCHOLTYSSEK 1987, RÜSSE und SINOWATZ 1998).

2.3.1 Embryonale Exkretion

Bei Säugetieren findet der Gasaustausch und die Nährstoffversorgung des Embryos über die Plazenta statt. Aufgrund der extramaternalen Entwicklung im Ei übernehmen bei Vögeln verschiedene Membranen und weitere Hilfsstrukturen diese Aufgaben. Eine schematische Darstellung eines 10-11 Tage alten Vogelembryos mitsamt den extraembryonalen Fruchthüllen zeigt Abbildung 1. Die Ernährung des Embryos geschieht über den maternal angelegten Eidotter sowie das Albumen; die Metabolisierung der Nährstoffe variiert mit dem Fortschritt der embryonalen Entwicklung (CLARK und FISCHER 1957, MORAN 2007). Die Stoffwechselendprodukte werden vom Embryo hauptsächlich in Form von Ammonium, Harnstoff und Harnsäure ausgeschieden. Zu Beginn der Embryonalentwicklung dient der Dottersack als Exkretionsorgan; mit dem ca. 4. bis 7. Tag der Embryonalentwicklung übernimmt diese

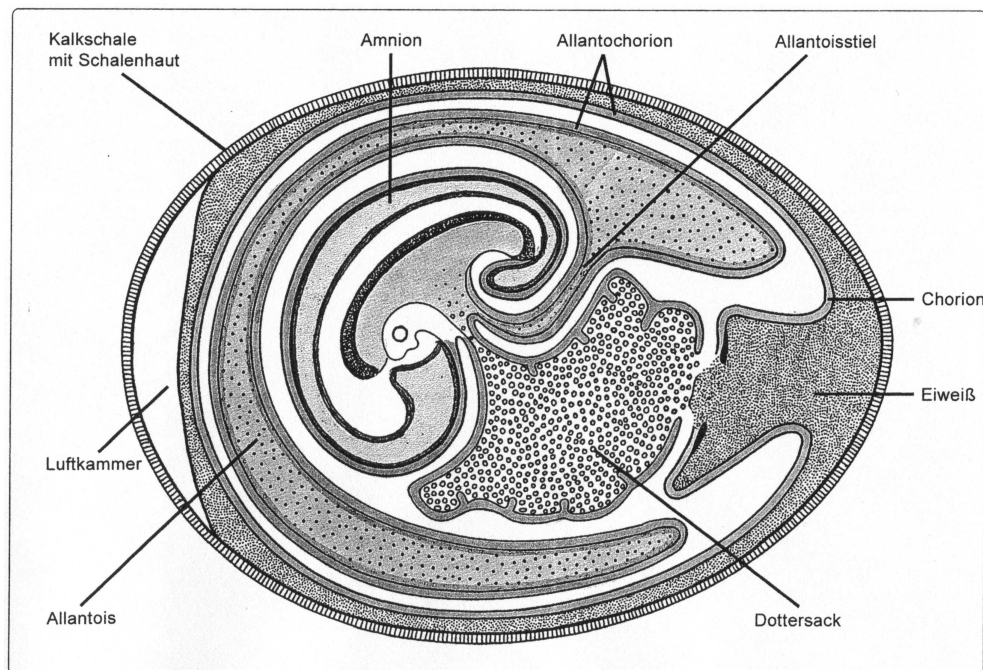


Abbildung 1: Embryonalhüllen des Huhnes (schematisch) am 10.-11. Bebrütungstag (modifiziert nach SCHNORR und KRESSIN 2011).

Aufgabe die Allantois (CLARK und FISCHER 1957). Die Bildung der Allantois beginnt am 3. Inkubationstag durch ein sackartiges Auswachsen aus dem Endteil des Primitivdarms (Kloake). Ab dem 4. Tag der Embryonalentwicklung dehnt sie sich zuerst in den extraembryonalen Teil der sekundären Leibeshöhle und anschließend über den Nabelstrang in den Hohlraum zwischen Chorion und Amnion aus. Mit dem 12. Entwicklungstag ist die maximale Ausdehnung erreicht; die Allantois umschließt nun sowohl den Dottersack als auch das Amnion. Der äußere mesodermale Anteil der Allantois verschmilzt mit der angrenzenden mesodermalen Schicht des Chorions zu einer mesodermalen Doppelschicht, der Chorioallantoismembran (CAM). In dieser bildet sich das Gefäßsystem des Allantoiskreislaufes, welcher vorrangig dem Gasaustausch dient (FREEMAN und VINCE 1974). In der Allantois sammeln sich ab dem 4. Tag der Embryonalentwicklung die Exkrete der embryonalen Nieren an. Die Volumenzunahme erfolgt bis zu einem Maximum von ca. 7 ml am 13. Tag der Bebrütung. Nach diesem Zeitpunkt wird das in der Allantoisflüssigkeit vorhandene Wasser durch Rückresorption dem Embryo erneut für Stoffwechselprozesse zur Verfügung gestellt. Infolgedessen erfolgt die Ausfällung der ausgeschiedenen Urate aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit, wodurch die vorher klare Allantoisflüssigkeit nun ein trübes Erscheinungsbild aufweist. Zum Zeitpunkt des Schlupfes ist fast keine Flüssigkeit mehr vorhanden und die Allantoishöhle ist mit unlöslichen Präzipitaten ausgefüllt (FREEMAN und VINCE 1974, ROMANOFF 1960).

2.3.2 Gonaden und endokrines System

Das Geschlecht wird bei Vögeln genetisch durch die Vererbung von Geschlechtschromosomen festgelegt. Im Gegensatz zu der Klasse der Säuger sind bei ihnen jedoch weibliche Tiere heterogametisch (Geschlechtschromosomen ZW) und männliche homogametisch (Geschlechtschromosomen ZZ). Daher wird das Geschlecht bereits vor der Befruchtung festgelegt (progame Geschlechtsdetermination) (LIEBICH 2010).

Der genaue Mechanismus der Geschlechtsdifferenzierung ist noch nicht abschließend erforscht. Diskutiert werden zwei mögliche Ansätze (CHUE und SMITH 2011, ELLEGREN 2000). Bei der sogenannten *Z-dosage*-Hypothese wird davon ausgegangen, dass das Geschlecht durch ein oder mehrere auf dem Z-Chromosom lokalisierte Gene determiniert wird. Da bei Vögeln im Gegensatz zu Säugern keine vollständige Dosiskompensation bei dem homogametischen Geschlecht stattfindet, werden diese Gene bei männlichen Tieren zweifach exprimiert (NANDA et al. 2000). Die Hauptrolle wird hierbei dem DMRT-1-Gen zugesprochen, welches auf dem Z-Chromosom lokalisiert ist und spezifisch im embryonalen Urogenitalsystem exprimiert wird (NANDA et al.

2000, SHAN et al. 2000, SMITH und SINCLAIR 2001). Die Hypothese des „dominanten W“ nimmt an, dass dominante, nur auf dem W-Chromosom vorhandene Gene eine Entwicklung zum weiblichen Geschlecht verursachen. Potentiell verantwortliche Gene wurden bereits identifiziert (z.B. ASW, FET-1). Allerdings konnte ihnen noch kein direkter Einfluss auf die Differenzierung primordialer Gonaden zu Ovarien nachgewiesen werden (SHAN et al. 2000, SMITH und SINCLAIR 2004). Daher gilt derzeit die *Z-dosage*-Theorie als wahrscheinlicher (SMITH et al. 2009).

Im Rahmen der Geschlechtsdifferenzierung erfolgt die Entwicklung der bei beiden Geschlechtern paarig angelegten primordialen Gonaden zu Ovarien bzw. Testes (SMITH und SINCLAIR 2004). Auf molekularbiologischer Ebene sind geschlechtsspezifische Unterschiede bereits an Tag 5 feststellbar. So ist die mRNA der P450-Aromatase in weiblichen, nicht jedoch in männlichen Gonaden nachweisbar. Dieses Enzym katalysiert den letzten Reaktionsschritt bei der Bildung von Östrogenen aus Androgenen und stellt somit ein Schlüsselement in der Biosynthese von Sexualsteroiden dar (NOMURA et al. 1999). Das Anti-Müller-Hormon (AMH) hingegen wird bei männlichen Embryonen deutlich stärker exprimiert. Im Gegensatz zu Säugetieren synthetisieren aber auch weibliche Vogelembryonen geringe Mengen AMH (NISHIKIMI et al. 2000). Eine morphologische Differenzierung der Gonaden kann ab Tag 6+12h der Inkubation festgestellt werden. Bei ZZ-Embryonen entwickeln sich aus den primordialen Gonaden beidseitig Testes, die Wolffschen Gänge differenzieren sich zu den *Vasa differentia* und die Müllerschen Gänge bilden sich zurück. ZW-Embryonen hingegen exprimieren nur in der linken Gonade den für die Differenzierung zum Ovar notwendigen Östrogenrezeptor (ER). Daher entwickeln sich bei ihnen linksseitig primordiale Gonade und Müllerscher Gang zu Ovar und Ovidukt, die entsprechenden Strukturen der rechten Seite atrophieren unter dem Einfluss des AMH; auch die Wolffschen Gänge bilden sich zurück (BRUGGEMAN et al. 2002, BRUNSTROM et al. 2009, SMITH und SINCLAIR 2004).

Trotz genetischer Determination spielen gonadale Sexualsteroiden für die Geschlechtsdifferenzierung eine wichtige Rolle. Insbesondere das Verhältnis von Östrogenen zu Androgenen ist dabei entscheidend. So führt die *In-ovo*-Behandlung von Hühnerembryonen mit einem Aromatase-Inhibitor vor der Gonadendifferenzierung bei ZW-Embryonen zu Ausbildung eines männlichen Phänotyps mit Spermien produzierenden Gonaden (ELBRECHT und SMITH 1992). Exogene Östrogene hingegen bewirken bei ZW-Embryonen eine Fehlentwicklung des Oviduktes. Die Tiere sind unfruchtbar oder zeigen zumindest einen verzögerten Legebeginn. Bei ZZ-Embryonen kommt es zu einer partiellen Feminisierung mit bilateraler Ausbildung von Ovotestes. Der bei Schlupf weibliche Phänotyp entwickelt sich innerhalb des ersten Lebensjahres wieder zurück (BRUNSTROM et al. 2009, RAHIL und NARBAITZ 1972).

Die endogene Steroidsynthese der Gonaden beginnt um Tag 3+12h der Embryonalentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt können mittels Immunzytochemie erstmals Steroide in den Gonaden detektiert werden (WOODS und ERTON 1978). Im Anschluss an die Synthese erfolgt eine Sekretion der Hormone in den Blutkreislauf. Testosteron ist erstmals an Tag 5+12h im Blutplasma messbar. Die anfangs bei männlichen und weiblichen Embryonen gleichen Testosteronkonzentrationen weisen ab Tag 7+12h geschlechtsspezifische Differenzen auf, wobei die Hormonkonzentrationen männlicher Embryonen signifikant höher sind (WOODS et al. 1975). Auch für das weibliche Sexualsteroid E₂ ist gezeigt worden, dass sich die Hormonspiegel im Blutplasma ab Tag 7+12h der Embryonalentwicklung signifikant zwischen den Geschlechtern unterscheiden; in diesem Fall besitzen weibliche Embryonen die höheren Hormonkonzentrationen (WOODS und BRAZZILL 1981). Da das Sterangerüst der Geschlechtshormone nicht ohne weiteres metabolisiert werden kann, ist davon auszugehen, dass sich Steroide bzw. deren Stoffwechselendprodukte im Laufe der Embryonalentwicklung im Ei ansammeln. Mögliche Ausscheidungswege des Embryos sind laut GILL et al. (1983) Niere und Galle; demnach ist eine Ansammlung der Hormone und ihrer Konjugate in der Amnion- und/oder Allantoisflüssigkeit anzunehmen. Für Östrogene ist von den vorgenannten Autoren gezeigt worden, dass eine Ausscheidung über die embryonalen Nieren in die Allantois stattfindet. In der erwähnten Studie können ausschließlich bei weiblichen Embryonen ab Tag 8-10 der Embryonalentwicklung Östrogensulfate und -glukuronide nachgewiesen werden, unkonjugierte Östrogene sind nicht detektierbar. Bei männlichen Embryonen lassen sich weder konjugierte noch unkonjugierte Östrogene messen. Diese Ergebnisse werden von EPPLÉ et al. (1997) nur teilweise bestätigt. In deren Studie können in der Allantoisflüssigkeit von 13-14 Tage alten Hühnerembryonen konjugierte Östrogene nachgewiesen werden; jedoch finden sich weder unkonjugierte Östrogene noch ungebundenes Testosteron. Eine Aufschlüsselung der Ergebnisse bezüglich des embryonalen Geschlechts wird hierbei allerdings nicht durchgeführt.

Eine Rückresorption der ausgeschiedenen Steroidkonjugate aus der Allantoisflüssigkeit findet nicht statt. Dadurch wird eine übermäßige Exposition des Embryos mit Sexualsteroiden vermieden (BENOWITZ-FREDERICKS et al. 2005, GILL et al. 1983).

2.3.3 Phasen der Embryonalentwicklung

Die 21 Tage andauernde Embryonalentwicklung des Huhnes lässt sich nach MORAN (2007) in drei Abschnitte einteilen: die Etablierung des Keimlings (Tag 1-7), Vervollständigung der Embryonalentwicklung (Tag 8-14) und abschließend von Tag 15-21 ein Abschnitt, welcher sich einerseits aus einer Schlupfvorbereitungsphase und

andererseits aus der letztendlichen Schlupfphase zusammensetzt. Jeder dieser Entwicklungsabschnitte unterscheidet sich u.a. bezüglich Atmung, grundlegender Stoffwechselvorgänge und Nährstoffmobilisation. Während des ersten Drittels der Embryonalentwicklung formieren sich die für das embryonale Überleben notwendigen extraembryonalen Strukturen (Amnion, Chorion, Allantois, Dottersack). Für deren korrekte Ausbildung ist eine regelmäßige Rotation des Embryos im Ei essentiell; das dafür notwendige Wenden der Eier erfolgt bei natürlicher Brut durch die Henne, bei künstlicher Brut i.d.R. vollautomatisch (NEW 1957). Aufgrund einer limitierten Sauerstoffversorgung dient die anaerobe Glykolyse der Nährstoffmobilisation aus dem Dotter, der unmittelbar an den Embryo angrenzt. Im zweiten Drittel ist die CAM vollständig ausgebildet. Diese stellt zusammen mit dem nun ausgebildeten extraembryonalen Blutgefäßsystem den Gasaustausch von CO₂ und O₂ sicher, der zum Ende dieses Abschnittes seine maximale Kapazität erreicht. Infolgedessen nutzt der Embryo fortan mittels β -Oxidation Fettsäuren als hauptsächliche Energiequelle. Physiologische Veränderungen im letzten Drittel beinhalten eine aufgrund des embryonalen Wachstums vermehrte Wärmeproduktion und einen gesteigerten Sauerstoffbedarf, die orale Aufnahme von Amnionflüssigkeit durch den Embryo, die Ansammlung von Glykogenreserven in Leber- und Muskelgewebe, das Einsetzen der respiratorischen Atmung sowie die Internalisierung des Dottersackes (DE OLIVEIRA et al. 2008, MORAN 2007). Die Übergangsphasen zwischen den einzelnen Abschnitten stellen für den Embryo kritische Entwicklungsperioden dar, in denen er besonders sensibel und anfällig ist (MORAN 2007); das korrekte Funktionieren sämtlicher physiologischer Prozesse ist für die Weiterentwicklung essentiell. Daher ist in diesen Zeiträumen eine vermehrte embryonale Mortalität zu verzeichnen, obwohl das ursächliche Ereignis für die Fehlentwicklung in jedem Stadium der Inkubation auftreten kann (HAMILTON 1952). Studien an Hühnerembryonen unterscheiden gemäß dem zeitlichen Auftreten im Laufe der Inkubation den frühen und den späten Embryonaltod. Verantwortlich für den erstgenannten (Tag 1-7) sind vorrangig eine nicht ausreichende Sauerstoffversorgung, Defekte in der Gastrulation und Störungen in der Ausbildung des Blutgefäßsystems (z. B. durch Erschütterung). Auch eine mangelhafte Wendung des Eies, welche u.a. für die physiologische Ausbildung von Allantois und Dottersackmembran sowie die frühe Ernährung des Embryos notwendig ist, wird diskutiert. Der späte Embryonaltod um Tag 19 der Inkubation wird u.a. durch eine zu dicke bzw. zu harte Eischale, Malpositionierung des Embryos, ein nicht stattfindendes Internalisieren des Dottersacks, zu hohe Bruttemperatur sowie durch eine zu hohe oder zu niedrige Luftfeuchtigkeit ausgelöst (HAMILTON 1952, NEW 1957, RIDDLE 1930). Bei WU et al. (2012) wird des Weiteren eine Geschlechtsprädisposition bezüglich des Absterbezeitpunktes festgestellt. Weibliche Embryonen sind demnach anfälliger für

einen frühen Embryonaltod und reagieren sensibler auf suboptimale Inkubationsbedingungen. Männliche Embryonen, die bereits während der Inkubation ein höheres Gewicht als weibliche Tiere haben (BURKE und SHARP 1989) und somit vor allem bei fortgeschrittener Entwicklung auch mehr Eigenwärme produzieren, sind anfälliger für zu hohe Bruttemperaturen und den späten Embryonaltod (WU et al. 2012).

2.3.4 Embryonales Schmerzempfinden

Die *International Association for the Study of Pain* definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht oder von betroffenen Personen so beschrieben wird, als wäre eine solche Gewebeschädigung die Ursache“ (IASP 2013). Von ZIMMERMANN (1983) wird eine für die Tiermedizin geltende Erweiterung der humanmedizinischen Auslegung vorgenommen: „Schmerz bei Tieren ist eine aversive Empfindungserfahrung, verursacht durch aktuelle oder potentielle Verletzung (Schädigung), die ihrerseits schützende motorische und vegetative Reaktionen auslöst, sowie erlerntes Meideverhalten bewirkt und das spezifische Artverhalten – einschließlich des Sozialverhaltens – modifizieren kann“. Die Übertragung dieser Definition auf das Schmerzempfinden von Embryonen erscheint schwierig. Empfindungsvermögen und Bewusstsein sind Voraussetzung für ein vorhandenes Schmerzempfinden; neben einem ausreichend ausgebildeten Nervensystem muss der Embryo somit die Empfindungen auch wahrnehmen können (MELLOR und DIESCH 2006). Im Falle des Hühnerembryos muss hierbei grundsätzlich zwischen den extraembryonalen und embryonalen Strukturen unterschieden werden. Die extraembryonalen Strukturen, wie das Gefäßsystem des Dottersacks und die CAM, besitzen keine Innervation und sind somit über den gesamten Entwicklungszeitraum schmerzunempfindlich (ROSENBRUCH 1997). Der Embryo selbst bildet ausgehend von Neuralrohr und Neuralplatte bis zum Schlupf ein hochdifferenziertes Nervensystem aus (BELLAIRS und OSMOND 1998). Das Gehirn eines Vogelembryos ist ab > 50 % der Embryonalentwicklung so weit entwickelt, dass es in der Lage ist, Schmerz zu empfinden (Embryonaltag 10 + 12 h beim Haushuhn) (CLOSE et al. 1997). Jedoch zeigen elektroenzephalographische Untersuchungen bei Hühnerembryonen, dass in den ersten 60 % der Embryonalentwicklung ein Bewusstsein unwahrscheinlich ist (Embryonaltag 12 + 14 h beim Haushuhn). Hierfür wird Bewusstsein von MELLOR und DIESCH (2007) als ein „wahrgenommener Stimulus, welcher den zerebralen Kortex involviert und eine Reaktion hervorruft“ definiert. Demnach ist eine Reaktion des Embryos auf eine potentiell schmerzhaft stimulierte Stimulation nicht zwangsläufig eine aversive Verhaltensweise, sondern kann auch reflexartig und unbewusst ablaufen (MELLOR und DIESCH 2007).

2.4 Geschlechtsbestimmung bei Eintagsküken von Legehybriden

In der Produktion von Legehennen gelangen sowohl weibliche als auch männliche Küken zum Schlupf. Für die Eierproduktion sind jedoch nur die weiblichen Tiere von Nutzen. Da das bei Säugern anwendbare Spermiensexen (GARNER 2001, JOHNSON 2000) aufgrund der progamen Geschlechtsbestimmung bei Vögeln nicht möglich ist (LIEBICH 2010), werden bei Legehybriden die Küken unmittelbar nach dem Schlupf ihrem Geschlecht entsprechend sortiert. Hühner besitzen bereits als Eintagsküken einen Geschlechtsdimorphismus. Geschlechtsassoziierte Merkmale, die dabei in der Praxis Verwendung finden, sind morphologische Unterschiede in der Kloakenform, die Geschwindigkeit der Befiederung und die Daunenfarbe. Auf diese Methoden soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2.4.1 Kloakensexen

Das Kloakensexen ist Anfang des 20. Jahrhunderts in Japan entwickelt worden und wird erstmals bei MASUI und HASHIMOTO (1933) beschrieben. Nach Einführung in Nordamerika in den 1930er Jahren wird es heutzutage weltweit angewendet. Kloakensexen dient vorrangig der Geschlechtsidentifizierung von Hühnern aus reinen Linien, da diese als Eintagsküken keinen weiteren Geschlechtsdimorphismus besitzen. Im Bereich der kommerziellen Produktion von Legehennen spielt diese Methode jedoch eine untergeordnete Rolle (LUNN 1948, SEEMANN 2003).

Die Technik basiert auf minimalen morphologischen Differenzen in der Kloakenöffnung männlicher und weiblicher Eintagsküken. Durch manuelles Entleeren und Ausstülpen der Kloake kann der Geschlechtshöcker beurteilt werden. Dieser ist bei allen männlichen Küken und ca. 40% der weiblichen Küken ausgebildet. Es gibt große zwischen- und innergeschlechtliche Variationsmöglichkeiten bezüglich Größe, Form und Lage in der Kloake (MASUI und HASHIMOTO 1933). Die Schwierigkeit besteht darin, innerhalb von Sekunden das Geschlecht korrekt zu beurteilen. Auch in der heutigen Zeit wird diese Arbeit fast ausschließlich von speziell ausgebildeten Asiaten durchgeführt, welche in der Lage sind, 800-1000 Tiere/Stunde mit 98%iger Genauigkeit zu sexen (BIEDERMAN und SHIFFRAR 1987).

Nachteilig ist die mögliche Kreuzkontamination mit Fäkalkeimen durch den Prozess des manuellen Entleerens der Kloake sowie eine um ca. 1% erhöhte Kükenmortalität durch Stress und Handling während des Sexens. Außerdem stellen Mitarbeiter, die nicht festangestellt sind und von Brüterei zu Brüterei fahren, ein mögliches Risiko für die Biosicherheit der Betriebe dar (PHELPS et al. 2003).

2.4.2 Federsexen

Auf den Geschlechtschromosomen einiger Hühnerrassen sind Gene lokalisiert, die den Phänotyp von Eintagsküken beeinflussen. Durch gezielte Kreuzungszucht sind einige dieser Merkmale auch in Hybridlinien eingebracht worden, welche derzeit in der Geflügelindustrie Verwendung finden. Bei den sogenannten autosexbaren Hühnerlinien unterscheiden sich männliche und weibliche Eintagsküken in Bezug auf Befiederungsgeschwindigkeit oder Färbung der Daunen (ROITER et al. 2011).

Im Falle der Befiederungsgeschwindigkeit wird das Allel für schnelle Befiederung (k) rezessiv und das Allel für die langsame Befiederung (K) dominant auf dem Z-Chromosom vererbt. Bei der Erzeugung von Hybridlinien wird K über die Hennenlinie und k über die Hahnenlinie eingekreuzt. Da das Gen das Wachstum der Schwungfedern beeinflusst, ergeben sich bei den Küken folgende Phänotypen: männliche Individuen befiedern langsamer, ihre Schwung- und Deckfedern sind ungefähr gleich lang. Weibliche Tiere hingegen befiedern schnell, ihre Schwungfedern sind immer länger als die Deckfedern (JACOB et al. 2011). Eingesetzt wird diese Methodik des Sexens bei weißen Leghorn oder weißen Mastelterntieren (DAMME und HILDEBRAND 2002).

Eine Unterscheidung anhand von geschlechtsabhängigen Farbvarianten kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Auf kommerziellem Niveau ist die Nutzung des Silberfaktors weit verbreitet. Dieser kann bei Braunlegehybriden zum Sexen genutzt werden (DAMME und HILDEBRAND 2002). Auch dieses Gen wird auf dem Z-Chromosom vererbt. Hierbei ist das Allel, welches bei Küken eine hellgelbe Daunenfärbung und bei adulten Tieren eine weiße Färbung des Gefieders verursacht, dominant (S). Dazu rezessiv ist ein Allel, welches zu einer Gold- bzw. Braunfärbung des Gefieders führt (s). Für die Erzeugung von farbsexbaren Hybriden wird eine silberfarbene Hennenlinie (S-) mit einer goldfarbenen Hahnenlinie (ss) gekreuzt. Die aus dieser Anpaarung entstehenden Küken sind entweder silberfarben (männlich) oder goldfarben (weiblich) (SCHOLTYSSSEK 1987).

Weitere Option für die Nutzung geschlechtsspezifischer Federfärbungen ist der Sperberfaktor (B), der Z-chromosomal vererbt wird. Er verursacht bei adulten Tieren eine streifenförmige Depigmentierung der Federn. Bei Küken zeigt sich die Sperberung durch einen weißen Kopffleck auf ansonsten dunklem Gefieder (DORSHORST und ASHWELL 2009). Da der Faktor unvollständig dominant gegenüber der Nichtsperberung (b) ist, exprimieren männliche Tiere des Genotyps BB breitere weiße Streifen als Männchen des Genotyps Bb. Bei Kreuzung eines nicht gesperberten Hahnes (bb) mit einer gesperberten Henne (B-) sind die adulten weiblichen Nachkommen nicht gesperbert und die männlichen gesperbert. Eintagsküken können anhand des weißen

Kopffleckes unterschieden werden, der nur bei männlichen Tieren ausgeprägt ist (JACOB et al. 2011). Verwendung findet diese Autosex-Variante bei Braunlegehybriden (DAMME und HILDEBRAND 2002).

Die Genauigkeit der Geschlechtsbestimmung mittels Federsexen ist von den genutzten Hybridlinien abhängig und kann zwischen 82-100% liegen (DAKPOGAN et al. 2012, GAWRON und SMYTH 1980, ROITER et al. 2011, SILVERUDD 1978). LEESON und SUMMERS (2009) weisen allerdings darauf hin, dass das Sexen von Eintagsküken unabhängig von der verwendeten Methodik ein manuell durchgeführter Vorgang ist, und somit mit (menschlichen) Fehlern gerechnet werden muss. Eine 100%ige Genauigkeit kann daher praktisch nicht erreicht werden (LEESON und SUMMERS 2009).

2.5 Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien

Im Anschluss an die Geschlechtsbestimmung der Eintagsküken folgt bei Legehybriden die Tötung aller männlichen sowie der nicht lebensfähigen Tiere beiderlei Geschlechts. Durch die europäische Gemeinschaft (EG) ist dies in der „Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung“ vom 24.09.2009 geregelt (ANON. 2009). Für Deutschland ist diese mit der „Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (TierSchlV)“ vom 20.12.2012 in nationales Recht umgesetzt worden. Als Küken werden dabei laut §2 TierSchlV alle Tiere bis zu einem Alter von 60 Stunden bezeichnet (ANON. 2012). Die Tötung darf in Deutschland mittels Zerkleinerung/Homogenisator oder CO₂-Begasung stattfinden. Dabei ist im Bezug auf das Homogenisieren eine sofortige Tötung der Tiere zu gewährleisten. Für eine CO₂-Begasung, die nicht zum Zwecke der Schlachtung erfolgt, müssen die Tiere in eine CO₂-Konzentration von mindestens 80% eingebracht werden und darin bis zu ihrem Tod, jedoch nicht weniger als 10 min. verbleiben. Vor dem Verbringen ist die CO₂-Konzentration zu überprüfen. Des Weiteren dürfen die Tiere nicht übereinanderliegend transportiert und begast werden (Anlage 1, ANON. 2012).

Rechtlich bewegt sich die Tötung männlicher Eintagsküken derzeit in einem Graubereich. So besagt das deutsche Tierschutzgesetz, dass niemand einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen darf. Außerdem wird das Töten von Tieren ohne vernünftigen Grund unter Strafe gestellt (ANON. 2006). Der „vernünftige Grund“ stellt einen sogenannten „unbestimmten“ Rechtsbegriff dar; er ist nicht konkret definiert und lässt Auslegungen zu (ORT 2010). Gesetzeskommentare zum deutschen Tierschutzgesetz machen jedoch deutlich, dass wirtschaftliche Interessen keine ausreichende Begründung für eine Tötung aus vernünftigem Grund sind (HIRT et

al. 2003). Trotz alledem stellt die Tötung von männlichen Eintagsküken derzeit keine Straftat dar. Da die gängige Praxis durch die zuständigen Behörden bisher nicht unterbunden worden ist, können die verantwortlichen Legehennenproduzenten zumindest von einer „Zulässigkeit ihres Tuns“ ausgehen (ORT 2010).

Für Deutschland sind Änderungen bezüglich der Gesetzgebung in den nächsten Jahren zu erwarten. Auf Länderebene gibt es erste Bestrebungen, das Töten von männlichen Eintagsküken zu untersagen. Diese basieren auf einer neuen Rechtsauffassung der Staatsanwaltschaft Münster, welche das Töten männlicher Eintagsküken aus Legelinien als tierschutzwidrig einstuft. Daraufhin hat das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MUNLV NRW) diese bisher gängige Praxis nach einer Übergangsfrist ab 01.01.2015 verboten (MUNLV NRW 2013). In Niedersachsen gibt es seit 2011 den durch das niedersächsische Ministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz beschlossenen „Tierschutzplan Niedersachsen“, welcher u. a. zum Ziel hat, auf die Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien zu verzichten (NI MELV 2011, 2014). Auch das Land Hessen beschäftigt sich mit der Problematik und unterstützt aktuelle Forschungen zur Entwicklung alternativer Methoden (LBT 2014).

2.6 Alternativen zur Tötung männlicher Eintagsküken

Aus ethischen Gesichtspunkten ist eine Tötung männlicher Eintagsküken nicht zulässig. Wie bei CASPAR (1997) dargelegt wird, widerspricht die Verfahrensweise, gezüchtete Tiere als Abfall zu entsorgen, den Wertvorstellungen sowie dem in Deutschland vorgegebenen Staatsziel Tierschutz. Mögliche Alternativen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.6.1 Zucht

Ein möglicher Gegenentwurf zur Tötung von männlichen Eintagsküken basiert auf züchterischen Maßnahmen. Als problematisch erweisen sich hierbei jedoch die äußerst gegensätzlichen Leistungsanforderungen an Legehennen und Broiler. Heutzutage kommen in der industriellen Geflügelproduktion ausschließlich Hybridlinien zum Einsatz, die durch gezielte Kreuzungszucht entweder auf Eiproduktion oder Mast spezialisiert sind. So wird bei Legehybriden unter anderem auf Legeleistung, effiziente Futtermittelverwertung (in Bezug auf produziertes Eigewicht) und Eiqualität selektiert. Bei Masthybriden stehen Masttagszunahmen, Futtermittelverwertung (in Bezug auf Fleischansatz) sowie eine gute Schlachtkörperzusammensetzung im Vordergrund (FLOCK et al. 2005).

2.6.1.1 Zweinutzungshuhn

Beim Ansatz der Zweinutzung soll die Spezialisierung auf Lege- und Mastlinien zumindest teilweise rückgängig gemacht werden. Ziel ist es, Hennen für die Eierproduktion und Hähne für die Mast zu verwenden. Problematisch ist hierbei die natürlicherweise vorkommende negative Korrelation von Wachstums- und Reproduktionseigenschaften. So führt z.B. die Selektion auf hohe Masttagszunahmen zu einer reduzierten Fertilität und einer Verminderung der Eiqualität. Eine erhöhte Legeleistung auf der anderen Seite führt zwangsläufig zu schlechteren Tageszunahmen (RAUW et al. 1998). Schon MÜLLER (1962) stellt fest, dass es keine Hühnerrasse gibt, die unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten sowohl für die Eier- als auch für die Fleischproduktion eingesetzt werden kann. Dies wird auch durch aktuellere Veröffentlichungen bestätigt. LEENSTRA et al. (2009) ermitteln, dass mit einer Preissteigerung um ca. 53% für Eier und ca. 43% für Fleisch (in Bezug auf das Lebendgewicht) zu rechnen ist, wenn Zweinutzungstieren anstatt von spezialisierten Hybridlinien zum Einsatz kommen. Auch für die Anfang 2013 durch die Lohmann Tierzucht GmbH vorgestellte Zweinutzungslinie „Lohmann Dual“ wird bestätigt, dass weder die Mast- noch die Legeleistungsdaten an die spezialisierter Hühnerlinien heranreichen. Die Verwendung dieser Linie würde also zwangsläufig zu höheren Verbraucherpreisen für Geflügelfleisch und Eier führen (ICKEN et al. 2013).

2.6.1.2 Aufzucht männlicher Legehybriden

Bei einer Aufzucht männlicher Legehybriden werden die Geschwisterhähne der Legehennen für die Mast genutzt. Dabei ergibt sich das bereits genannte Problem der negativen Korrelation von Wachstum und Reproduktion. Die in den letzten Jahrzehnten durchgeführte Selektion der Legehybriden hat zu einer hohen Legeleistung pro Tier sowie einer guten Futterverwertung in Bezug auf das produzierte Eigewicht geführt. Obwohl sie im Vergleich zu Broilerlinien einen ähnlichen Wachstumskurvenverlauf zeigen, sind die Endgewichte der Legehybriden deutlich niedriger (GRIFFIN und GODDARD 1994). Legelinien zeichnen sich vor allem in den ersten Lebenswochen durch ein langsames Körperwachstum aus; im Vergleich zu Mastlinien ist die Wachstumsrate pro Tag um das 1,7-fache niedriger (GODDARD et al. 1988, GRIFFIN und GODDARD 1994). Dies ist unter anderem auf ein niedrigeres Futteraufnahmevermögen, eine schlechtere Futterverwertung in Bezug auf die Gewichtszunahme sowie eine andere Muskelzusammensetzung (geringere Anzahl sowie kleinerer Durchmesser der Myofibrillen) bei den Legelinien zurückzuführen (BOKKERS und KOENE 2003, HOCKING et al. 1997, MASIC et al. 1974, REMIGNON et al. 1995). Daraus ergeben sich für Legehybriden im Vergleich zu Broilern erhöhte Futterkosten sowie eine verlängerte Mastdauer. Hinzu kommen ein niedrigeres Schlachtgewicht sowie eine nachteilige

Schlachtkörperzusammensetzung. Beide Nutzungslinien unter den gleichen Haltungsbedingungen zu mästen ist daher aus ökonomischer Sicht problematisch. Bezogen auf das Lebendgewicht der Tiere würde die Aufzucht männlicher Legehybriden zu einer ca. 83%igen Preissteigerung führen (DAMME und RISTIC 2003, LEENSTRA et al. 2009).

Die Unterschiede zwischen den Nutzungslinien bezüglich der Mastleistung verringern sich unter extensiven oder semiextensiven Haltungsbedingungen (GERKEN et al. 2003); somit wäre die Verwendung von männlichen Legehybriden zur Mast im ökologischen Landbau denkbar. Hier wird durch die EG entweder die Verwendung von langsam wachsenden Linien oder die Einhaltung eines Mindestschlachtalters von 81 Tagen bei schnell wachsenden Linien vorgeschrieben (ANON. 2008a). Wird diese Mastdauer mit kommerziellen Mastlinien eingehalten, sind die Tiere aufgrund ihres schnellen Wachstums in der Regel zu schwer für die Vermarktung. Zusätzlich neigen sie bei verlängerter Mast zu einer vermehrten Verfettung, was für die wirtschaftliche Verwertung von Nachteil ist (DAMME und RISTIC 2003, LICHOVNÍKOVÁ et al. 2009). Bei männlichen Legehybriden hingegen sind unter einer derart verlängerten Mast eine geringere Verfettung und daraus resultierend eine bessere Fleischqualität nachweisbar (LICHOVNÍKOVÁ et al. 2009). Nichtsdestotrotz ist jedoch ihre Schlachtkörperzusammensetzung den Mastlinien unterlegen (MURAWSKA und BOCHNO 2007). Auch im Vergleich zu extensiven Bio-Masthühnern schneiden die Legehybriden in Bezug auf Mast- und Schlachtleistung schlechter ab (SCHAEUBLIN 2005).

Die Produktion von Stubenküken ist eine weitere Option zur Nutzung männlicher Legehybriden. Hierbei werden die Tiere nicht bis zu einem Mastendgewicht von ca. 1500g herangezogen (Dauer ca. 80 Tage; DAMME und RISTIC 2003), sondern bis zu einem maximalen Schlachtgewicht von 650g (ohne Innereien, Kopf und Ständer; maximal 750g bei einem Alter <28 Tage) gemästet (ANON. 2008b). Für dieses Zielgewicht wird nur eine Mastdauer von ca. 49 Tagen benötigt, wodurch sich die Futterverwertung der Tiere und somit die Rentabilität verbessert. Trotz alledem sind auch hier die Mastlinien den Legelinien überlegen. Um ein Schlachtgewicht von 650g zu erreichen, müssen die Broiler nur 19 Tage gemästet werden und besitzen zusätzlich eine bessere Schlachtkörperzusammensetzung (KOENIG et al. 2012, SONDER 2012).

2.6.2 *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung

Eine weitere Alternative zur Tötung männlicher Legehybriden ist die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung. Im Gegensatz zu einer wirtschaftlichen Nutzung der männlichen Geschwisterküken wird hierbei das embryonale Geschlecht im Ei bestimmt

und anschließend eine Eliminierung der männlichen Embryonen noch vor dem Schlupf durchgeführt. Dadurch kann die Tötung bereits geschlüpfter Tiere vermieden werden. KALETA und REDMANN (2008) haben Kriterien für die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung aufgestellt, die ihrer Ansicht nach zumindest teilweise erfüllt werden sollten. Hierzu gehören: ein ethisch vertretbares Verfahren, Anwendbarkeit bei großen Stückzahlen und gleichzeitig niedrigem Stückpreis, Anwendbarkeit am nicht bebrüteten Ei unter Beibehaltung der Integrität von Eischale und Eiinhalt, sinnvolle Nutzung der Eier mit männlichen Keimscheiben bzw. Embryonen, keine negative Beeinflussung von Embryonalentwicklung, Schlupfrate, Verhalten und Leistung der heranwachsenden bzw. adulten Tiere sowie der weiblichen Reproduktion (KALETA und REDMANN 2008). Vor allem die geforderte Integrität der Eischale stellt eine entscheidende Schwierigkeit dar. Einzig der Ansatz von IMHOLT (2010), durch morphometrische Analyse der Eiform Informationen über das Geschlecht der Küken zu erhalten, wird diesem Kriterium gerecht. In dieser Studie können jedoch keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Eiform und Geschlecht festgestellt werden (IMHOLT 2010). Somit ist derzeit für alle weiteren beschriebenen Verfahren der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung eine Perforation der Eischale unerlässlich. Die Methoden lassen sich unabhängig vom Detektionssystem in zwei Gruppen unterteilen: Geschlechtsbestimmung am nicht bebrüteten Ei und Geschlechtsbestimmung am bebrüteten Ei. Alle im nachfolgenden beschriebenen Ansätze befinden sich derzeit noch in der Entwicklung; eine praktische Anwendung in kommerziellen Brütereien findet noch nicht statt.

2.6.2.1 Nicht bebrütetes Hühnerei

Die Keimscheibe von männlichen und weiblichen Hühnerembryonen besteht bei Eiablage aus 32.000–42.000 Zellen (BELLAIRES und OSMOND 1998). Durch Analyse dieser Zellen mittels verschiedener Methoden kann bereits beim nicht bebrüteten Ei eine Geschlechtsidentifikation stattfinden. Voraussetzung ist eine sichere Lokalisation der Keimscheibe (BURKHARDT et al. 2011). Dies ist mittels Magnetresonanztomographie durch eine intakte Eischale sowie bei Anwendung von optischer Kohärenztomographie (OCT) durch eine eröffnete Eischale möglich (BARTELS et al. 2008, KLEIN et al. 2002). Die Perforierung der Eischale hat, sofern sie vor Beginn der Inkubation durchgeführt wird, keinen negativen Einfluss auf das Schlupfergebnis (KLEIN et al. 2003). Für die Untersuchung muss Zellmaterial aus der Keimscheibe entnommen werden; spätestens zu diesem Zeitpunkt muss daher eine Eröffnung der Eischale stattfinden. In einer Studie, welche die Auswirkung einer Zellentnahme aus der Keimscheibe bei kultivierten Embryonen untersucht, werden zwischen Kontrollgruppe (Hühnerembryo in Kultur ohne Zellentnahme) und Versuchsgruppe (Entnahme von 10 bis einigen 100 Zellen) keine signifikanten Unterschiede in der Embryonalentwicklung

festgestellt. Im Vergleich zu nicht behandelten Embryonen, welche in intakten Eiern ausgebrütet worden sind, sind jedoch deutliche Unterschiede in der Embryonalentwicklung zu sehen: nur 87% der Kontrollgruppe und 90% der Versuchsgruppe entwickeln sich wie die nicht behandelten Embryonen (KLEIN und ELLENDORFF 1998).

Da das Z-Chromosom im Vergleich zum W-Chromosom einen höheren DNA-Gehalt aufweist, besitzt die Keimscheibe von männlichen Embryonen insgesamt ca. 2% mehr DNA (HUTCHISON 1987, TIERSCH 2003). Diese Differenz lässt sich mit der Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie (FTIR) darstellen. Die unterschiedlichen Gehalte an Phosphatgruppen bei männlichen und weiblichen Chromosomen führen zu differierenden Absorptionsspektren. Durch eine hohe räumliche Auflösung kann eine Selektion der Spektren vorgenommen werden und somit eine nachfolgende Analyse nur mit für die Blastodermzellen wichtigen Spektren stattfinden. Derzeit ist es in Laborversuchen möglich, anhand von entnommenen Blastodermzellen mit sehr hoher Genauigkeit das Geschlecht zu klassifizieren (STEINER et al. 2011). *In-vivo*-Studien mit diesem Versuchsansatz sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert, sodass der Einfluss der Probenentnahme auf Embryonalentwicklung, Schlupferfolg sowie Leistungsparameter der adulten Tiere noch nicht abgeschätzt werden kann.

Der geschlechtsabhängige Unterschied im DNA-Gehalt der Keimscheibe kann auch mittels Durchflussszytometrie detektiert werden. Nach Perforation der Eischale und Lokalisation der Keimscheibe müssen auch für diesen Ansatz Blastodermzellen entnommen werden. Die Zellen werden lysiert und die Nukleinsäuren fluoreszenzmarkiert. Im Anschluss wird die Fluoreszenz der Kerne gemessen, welche proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist. Aufgrund von natürlicherweise vorkommenden Variationen im Signal von Z- und W-Chromosomen ist es sehr wahrscheinlich, dass keine 100% richtige Geschlechtsbestimmung möglich ist (TIERSCH 2003); eine Studie hierzu liegt allerdings nicht vor. Ebenso wie bei der FTIR fehlen auch für die Durchflussszytometrie noch belastbare Aussagen über den Einfluss des Verfahrens auf die weitere Entwicklung des Embryos.

Auch mittels molekularbiologischer Methoden ist eine Geschlechtsidentifizierung nicht bebrüteter Eier möglich. Grundsätzlich bedienen sich alle bekannten Methoden einer der beiden folgenden Ansätze.

Der Erste basiert auf Genen, welche sowohl auf dem W- als auch auf dem Z-Chromosom vorhanden sind und sich nur in der Länge ihrer Introns voneinander unterscheiden. Die verwendeten Primer amplifizieren demnach je nach Geschlecht unterschiedlich lange PCR-Produkte, welche durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Ein

Beispiel ist das häufig verwendete Chromobox-Helicase-DNA-Bindungsprotein-1 (CHD-1)-Gen, welches mit den Primern 2550F/2718R (FRIDOLFSSON und ELLEGREN 1999), 1237L/1272H (ST JOHN und QUINN 1998) sowie P2/P8 (GRIFFITHS et al. 1998) amplifiziert werden kann. Für eine Geschlechtsbestimmung am nicht bebrüteten Ei muss embryonales Zellmaterial aus der Keimscheibe entnommen werden. Schon geringfügige Verunreinigungen mit der Dottermembran, welche sowohl maternale als auch paternale DNA-Gehalte aufweisen kann, führen zu Fehlern bei der Geschlechtsdiagnose (ARNOLD et al. 2003).

Bei dem zweiten Ansatz handelt es sich um die Verwendung der vorwiegend auf dem W-Chromosom lokalisierten Xho-1-Wiederholungssequenz zur Geschlechtsidentifikation. Mittels PCR und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können diese Sequenzen bei weiblichen Blastodermzellen aus nicht bebrüteten Eiern nachgewiesen werden (KLEIN und ELLENDORFF 2000, PETITTE und KEGELMEYER 1995). Im direkten Vergleich zeigte die FISH hierbei eine 100%ige Trefferquote, wohingegen bei der PCR ca. 31 % der Proben dem falschen Geschlecht zugeordnet wurden (KLEIN und ELLENDORFF 2000).

2.6.2.2 Bebrütetes Hühnerei

Die verschiedenen Methoden zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei basieren auf molekularbiologischen oder endokrinologischen Verfahren. Eine Geschlechtsdiagnostik kann abhängig von der verwendeten Technik zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation erfolgen. Eine Perforation der Eischale sowie eine minimalinvasive Entnahme von Probenmaterial (Blut, Allantoisflüssigkeit) werden für alle Lösungsansätze benötigt.

Sowohl der Zeitpunkt als auch die Technik der Probenentnahme haben einen entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung nach der Beprobung. Eine Blutentnahme zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Inkubation (Stadium 14-18 nach HAMBURGER und HAMILTON (1951), entspricht einem ca. 2 Tage alten Embryo) führt zu nicht akzeptablen Schlupfergebnissen von 0-25 %. Dahingegen können bei einer Blutentnahme zwischen Stadium 30 und 42 nach HAMBURGER und HAMILTON (1951), welches einem Embryonalalter von 6-16 Tagen entspricht, Schlupfraten von 66,7-100% beobachtet werden (JENSEN et al. 2011). Für die Blutentnahme werden extraembryonale Gefäße verwendet; hierfür sind zwei Techniken beschrieben. DUTTON und TIEBER (2001) durchleuchten die Eier, um große Blutgefäße sichtbar zu machen. Anschließend wird die Eischale direkt über dem Blutgefäß aufgebohrt und das Blutgefäß wird unter Verwendung einer Insulinspritze punktiert. Aufgrund der sehr kleinen Gefäßdurchmesser kann diese Technik erst ab Tag 10-11 der Inkubation angewendet werden (DUTTON und TIEBER 2001). Des Weiteren kann eine großflächigere Eröffnung

der Eischale, die sogenannte Fenestrierung, vorgenommen werden. Hierbei wird ein Teil der Eischale abgeschliffen, sodass die Eihäute mit den darunterliegenden Blutgefäßen sichtbar werden. Zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Inkubation sind so Gefäße der Dottermembran, später auch der CAM punktierbar (JENSEN et al. 2011).

Die Lokalisation der Allantois ist im Gegensatz zu der Lage der Blutgefäße nicht individuell unterschiedlich. Sie dehnt sich unter der Eischale aus und ist von dieser nur durch die Schalenhäute getrennt. Abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos enthält die Allantois bis zu 7ml Flüssigkeit (ROMANOFF 1960). Da die Allantoisflüssigkeit eine geringere Dichte als Embryo und Dotter aufweist, sammelt sie sich in horizontaler Lagerung immer am höchsten Punkt unterhalb der Eischale an und kann dort nach Perforation der Eischale punktiert werden (PHELPS et al. 2003, RICKS et al. 2003).

2.6.2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die Methoden der molekularbiologischen Nachweisverfahren decken sich mit den Techniken der molekularbiologischen Geschlechtsidentifizierung am nicht bebrüteten Ei. CLINTON et al. (2001) beschreiben die Geschlechtsbestimmung von Hühnerembryonen anhand einer PCR von Zellen aus der Amnionflüssigkeit 5 + 12 h und 8 + 12 h Tage alter Embryonen. Verwendet werden Primer, welche ein 415 Basenpaare langes Produkt der Xho-1-Gensequenz auf dem W-Chromosom amplifizieren. Als Kontrollreaktion wird zusätzlich eine bei beiden Geschlechtern vorkommende ribosomale Gensequenz (18S-Ribosom, Position 1267 bis 1522) vervielfältigt (CLINTON et al. 2001).

Die gleiche Gensequenz wird von KLEIN und ELLENDORFF (2000) verwendet, um mittels PCR und FISH Hühnerembryonen zwischen Tag 3 und 11 der Embryonalentwicklung zu sexen. Als Zellmaterial dient aus Blut extrahierte DNA. Beide Methoden erzielen eine 100%ige Genauigkeit (KLEIN und ELLENDORFF 2000). Im Gegensatz dazu nutzen JENSEN et al. (2011) die CHD-1-Gensequenz aus Blut extrahierter DNA, um sowohl mit den Primern P2/P8 als auch 1273L/1272H bei insgesamt 14 Vogelarten zehn verschiedener Ordnungen erfolgreich das Geschlecht zu bestimmen.

Eine Methode, welche ohne PCR auskommt, ist die direkte Detektion von genomischer Hühner-DNA mittels Thymin-DNA-Glykosylase, welche erstmals von PORAT et al. (2011) beschrieben wird. Verwendung findet eine Sequenz des CHD-1-Genes, welche sich auf dem Z- und dem W-Chromosom nur durch eine einzige Basenpaarung unterscheidet. Zuerst erfolgt die Extraktion und Denaturierung der DNA. Im Vergleich zu

PCR basierten Verfahren ist keine Amplifikation von DNA notwendig. Die Einzelstränge werden mit einer Sonde rehybridisiert, welche komplementär zur Gensequenz des Z-Chromosoms ist, beim W-Chromosom jedoch zu einer Thymin – Guanin Fehlpaarung führt. An die Sonde sind ein Fluoreszenzfarbstoff sowie ein sogenannter *Quencher* gekoppelt, welcher die fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes unterdrückt, solange sich dieser in unmittelbarer Nähe befindet. Die zugegebene Thymin-DNA-Glykosylase erkennt die Fehlpaarung auf dem W-Chromosom und schneidet die fehlerhafte Thyminbase aus der Gensequenz der Sonde heraus; dadurch werden Fluoreszenzfarbstoff und *Quencher* voneinander getrennt. Somit kann nur bei weiblichen Embryonen eine entstehende Fluoreszenz detektiert werden. Das beschriebene Verfahren ist an aus Blut extrahierter DNA etabliert worden; die potentielle Anwendung bei Zellen aus der Amnionflüssigkeit wird diskutiert (PORAT et al. 2011).

2.6.2.2.2 Endokrinologische Methoden

Das Geschlecht der Hühnerembryonen kann auch indirekt über eine Detektion von Hormondifferenzen identifiziert werden. Verwendbare Medien sind Blut sowie die embryonal gebildete Allantoisflüssigkeit, in welche die Steroide nach Biotransformation in der Leber über die Nieren ausgeschieden werden (ROMANOFF 1960). Dotter und Albumen sind aufgrund ihres maternalen Ursprungs weniger geeignet. Vor allem im lipidhaltigen Dotter sind viele durch die Henne gebildete lipophile Steroide enthalten. Da diese Hormone während des Eibildungsprozesses konzentrisch in den Dotter eingelagert werden, ist außerdem keine homogene Verteilung vorhanden (ENGELHARDT et al. 2009, LIPAR et al. 1999).

Geschlechtsabhängige Konzentrationsunterschiede von E₂ und Testosteron können mittels Radioimmunoassay (RIA) im Plasma von Hühnerembryonen an Inkubationstag 7 + 12 h (WOODS und BRAZZILL 1981, WOODS et al. 1975) und 10 (TANABE et al. 1986) nachgewiesen werden. Eine auf dieser Grundlage basierende Methodik der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert. Im Gegensatz dazu ist auf Grundlage des von GILL et al. (1983) beschriebenen Nachweises von Östrogenmetaboliten in der Allantoisflüssigkeit weiblicher Hühnerembryonen ein Verfahren zum *In-ovo*-Sexen entwickelt worden (BUTT und TRAN 2006, PHELPS et al. 2003, TRAN et al. 2010). Als Detektionssystem dient kein RIA, sondern ein ER-Transaktivierungsassay auf der Basis von Hefezellen. Da der verwendete ER ausschließlich E₂ bindet, die Östrogene in der Allantois aber vorwiegend in konjugierter Form vorliegen (GILL et al. 1983), wird Initial eine β -Glukuronidase zur Aufspaltung zugegeben. Das so entstandene E₂ induziert bei Bindung an den Östrogenrezeptor die

Transkribierung eines Reportergens, wobei der Grad der Induktion konzentrationsabhängig ist. Die Konzentration des Reportergenproduktes, einer β -Galaktosidase, kann unter Verwendung eines spezifischen Substrates kolorimetrisch gemessen werden. Diese Farbreaktion ist nur bei weiblichen Tieren vorhanden; so kann das Geschlecht von Hühnerembryonen an Tag 17 der Inkubation zu 100% richtig bestimmt werden. Die Schlupfrate der Küken reduziert sich durch die Entnahme der Allantoisflüssigkeit um ca. 0-2% (PHELPS et al. 2003, TRAN et al. 2010).

Ein weiteres Verfahren zur Ermittlung von Hormonkonzentrationen ist der Enzymimmunoassay (ELISA). Dieses Testsystem hat gegenüber dem RIA mehrere praktische Vorteile. Erstens basiert der Nachweis der gemessenen Konzentration im ELISA auf einer enzymatischen Farbreaktion und nicht wie im RIA auf einer Detektion der Radioaktivität. Somit entfallen die bei Verwendung radioaktiver Substanzen geltenden Vorschriften und Sicherheitsvorkehrungen. Des Weiteren benötigt die Bestimmung der Hormonkonzentration mittels Photometer weniger Zeit als die Radioaktivitätsmessung. Zusätzlich sind die im ELISA genutzten chemischen Substanzen länger stabil und sind somit besser zu lagern (SCHURRS und VAN WEEMEN 1980). Für den Hormonnachweis in verschiedenen Exkreten, wie z.B. Urin, Faezes oder Milch, gilt das Verfahren bereits als etabliert (HAHN et al. 2011, MUNRO et al. 1991, VOLKERY et al. 2012). Im Hinblick auf die Geschlechtsidentifikation aviärer Embryonen existieren derzeit jedoch keine publizierten Studien, in denen die Konzentration von Sexualsteroiden im Blut oder einem anderen Medium mittels ELISA gemessen worden ist.

3 ERGEBNISSE

3.1 Publikation 1

Anne Weissmann, Susanne Reitemeier, Anke Hahn, Jutta Gottschalk, Almuth Einspanier

Sexing domestic chicken before hatch: A new method for *in ovo* gender identification

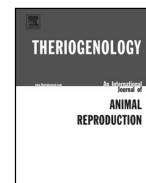
Theriogenology. 2013; 80:199–205. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.014



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Sexing domestic chicken before hatch: A new method for *in ovo* gender identification

A. Weissmann, S. Reitemeier, A. Hahn, J. Gottschalk, A. Einspanier*

Institute of Physiological Chemistry, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2013

Received in revised form 17 April 2013

Accepted 17 April 2013

Keywords:

Sexing

Domestic chicken

In ovo

Endocrine analysis

ABSTRACT

Male chicks are an unwanted by-product when producing laying hens. The common practice to kill them directly after they have hatched gives rise to ethical concerns worldwide. The aim of this study was to develop an endocrine method to determine the sex of domestic chicken before hatch. On Days 7 to 10 of incubation, the allantoic fluid from brown layers' eggs ($n = 750$) was analyzed via enzyme immunoassay for their content of estradiol, estrone sulfate, and testosterone in order to detect gender differences. We successfully established a reliable method for *in ovo* sex identification on Day 9 of incubation by estrone sulfate measurement in the allantoic fluid. Female embryos displayed significantly higher hormone levels in the allantoic fluid than males (female: median = 0.312 ng/mL; male: median = 0.110 ng/mL; $P \leq 0.001$). Our method allows the sexing of domestic chicken at a very early stage of embryonic development, even before the onset of pain perception. The possibility to eliminate eggs containing male embryos on Day 9 of incubation represents a vast improvement compared with culling day-old chicks.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Today, meat and egg production are highly specialized sectors of poultry industry with only little profit margins. The daily gains and feed utilization of male layers are less efficient compared with broiler chicken. This is the reason for the annual culling of about 40 million day-old male chicks in Germany; across the EU, 300 million male chicks are killed each year [1]. Considering animal welfare acts of Germany and Austria that permit animal killing only for good purpose [2,3], this unacceptable situation is a multi-national trigger for ethical debates.

One way of solving this predicament is *in ovo* gender identification of domestic chicken and the accompanying possibility to eliminate the male embryos before they hatch. So far, two different approaches are being adhered to: gender identification of chicken embryos in the not incubated egg and gender identification in the incubated egg.

Recent studies report the sexing of fertilized chicken eggs before incubation by two different techniques. One detects gender differences in the DNA content via infrared spectroscopic imaging of blastoderm cells [4]. The other technique uses molecular biology methods to sex not incubated chicken embryos. Embryonic cell material is analyzed via polymerase chain reaction for the female-specific *Xho1* repetitive element [5] or the CHD-1 genes [6]. Nevertheless, all methods are not yet tested under *in ovo* conditions and, therefore, not ready for large-scale usage in hatcheries.

The methods described for gender determination in the incubated egg are on the basis of endocrine variances between males and females. In chicken embryos, first measurable gender differences manifest in their plasma levels of sex steroids on Day 7.5 of incubation [7,8]. Because of the individual localization of extra-embryonic vessels, the sampling of peripheral blood as described in previous publications [9,10] is not suitable as a standardized minimally invasive technique. Thus, the analysis of plasma is an inapt approach for identifying embryonic hormone differences in large-scale industrial usage.

* Corresponding author. Tel.: +49 341 9738102; fax: +49 341 9738119.
E-mail address: einspanier@vetmed.uni-leipzig.de (A. Einspanier).

This study explores the allantoic fluid as a medium for endocrine gender determination. Sex steroids, which are secreted into the blood, get metabolized in the liver. After excretion via the kidneys, they accumulate in the allantoic fluid, the embryonic urine [11]. By analysis for gender-related hormones, one can therefore indirectly distinguish the embryonic sex. Advantageously, the allantois is easier to localize than extra-embryonic vessels. It starts to form on Day 3 of embryonic development and continues to enlarge directly under the eggshell until it encloses the complete egg's content [12].

In this study, we report a new method for *in ovo* sex identification of incubated domestic chicken eggs. To improve the animal welfare situation, we aimed to develop an endocrine method that allows gender determination before the onset of embryonic pain perception on Day 10.5 of incubation. The allantoic fluid of incubated brown layers' eggs was analyzed for sex steroids (estradiol, testosterone), as well as their metabolites (estrone sulfate) on Days 7 to 10 of incubation. The different endocrine markers were evaluated with regard to their suitability for gender identification according to their significance, practicability, and reliability.

2. Materials and methods

2.1. Incubation regime

For this study, fertilized eggs from Lohmann brown layers (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Germany) were used ($n = 975$). Incubation took place in HEKA-Turbo 168 incubation and hatching devices (HEKA Brutgeräte, Rietberg, Germany). The eggs were set in incubators at 37.8 °C and 52% to 56% humidity with full automatic turning. On Day 18 of incubation, they were transferred into the hatcher, placing each egg individually in acrylic glass grids. Humidity increased up to 70% to 80% during hatching, as suggested by the egg supplier [13]. Just like natural brooding, hatching took place on Day 21 ± 1.

2.2. Sample collection

The allantoic fluid of chicken embryos was examined on distinct days of incubation. A preliminary study was conducted on Days 7, 8, 9, and 10 of incubation, and the allantoic fluid of 20 eggs was sampled and assayed for estradiol (E_2), estrone sulfate (E_1S), and testosterone (T). For the main study, which concentrated on E_2 and E_1S , a larger number of eggs were evaluated to substantiate the results observed in the preliminary study (Day 7: $n = 150$; Day 8: $n = 150$; Day 9: $n = 300$; Day 10: $n = 150$).

Before specimen collection, fertilization of the eggs was ascertained by candling. For sampling, two different egg positions were evaluated: position A (Fig. 1) and position B (Fig. 2). The allantoic fluid, being of a lower density than the embryo and the yolk sac, always accumulates at the highest possible point directly under the eggshell. At this localization, it was accessible for withdrawal. Incubating the eggs for 15 minutes at 37.8 °C in the appropriate position allowed the allantois to pool under the eggshell. The intended sampling localization (position A: highest point of the

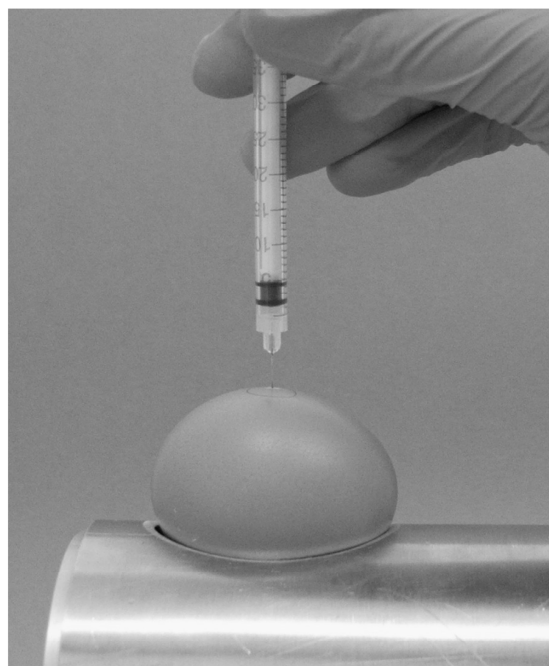


Fig. 1. Sampling of allantoic fluid in position A. The egg is placed horizontally, which causes the allantoic fluid to pool at the eggs highest point.

eggshell; position B: 0.5 cm next to the air chamber) was marked on the shell and disinfected with ethanol [14]. A 0.5-mm hole was drilled into this area using a drill fixed in a drill stand (Micromot 50/E, Micromot MB 140/S; Proxxon, Föhren, Germany). Allantoic fluid (20–50 µL) was sampled using an insulin syringe (Omnican 40; B. Braun, Melsungen, Germany) and immediately transferred into 1.5 mL polystyrene tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). Because sealing the hole does not improve the hatching rates [14], we refrained from this procedure. Seven days after each time point of sampling, the eggs were examined for a living embryo by candling.

To evaluate the influence of sampling on hatching rate and embryo development, untreated control groups ($n = 225$) were hatched. The control eggs were set simultaneously in the same incubators as the eggs used for sampling the allantoic fluid.

2.3. Hormone analysis

The collected allantoic fluid was deep-frozen at –20 °C until further use. The samples were analyzed for E_2 , E_1S , and T via competitive enzyme immunoassay (ELISA).

For the E_2 and T analyses, the allantoic fluid (15 µL) was diluted in ethanol (150 µL) and centrifuged. The supernatant was vaporized at 40 °C for 25 minutes and resuspended with buffer (sodium hydrogen phosphate, sodium chloride (both Merck, Darmstadt, Germany), bovine serum albumin (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) dissolved in ddH₂O, pH 7.2). No preconditioning was conducted for E_1S analysis. Before assaying, the allantoic fluid was diluted with buffer.

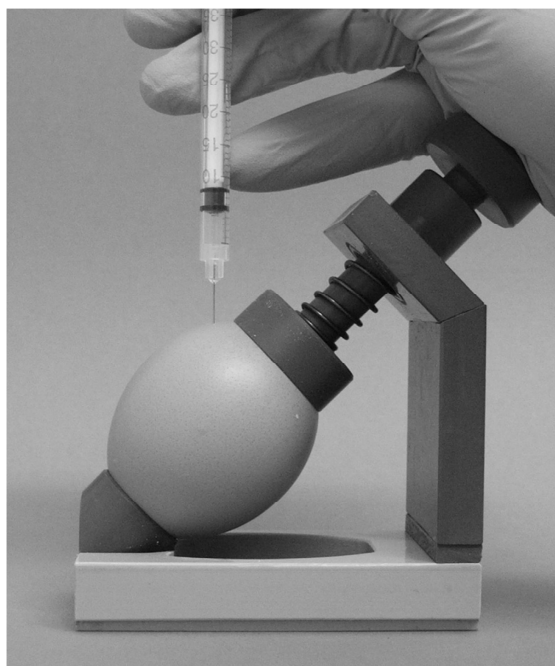


Fig. 2. Sampling of allantoic fluid in position B. The egg is placed in a 45° gradient with the air chamber pointing upward. The allantoic fluid can be sampled in the area next to the air chamber.

Ninety-six well plates (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) coated with sheep anti-rabbit IgG (dilution 1:100 for E₁S and T, dilution 1:500 for E₂; Technische Universität München Institute of Physiology, München, Germany) were used in all assays.

E₁S and T assays, as previously published [15,16], were modified and adapted to domestic chicken. The calibration curves were sensitized to ensure reliable measurement of low hormone concentrations (E₁S: 0.0125–5 ng/mL; T: 0.025–6.25 ng/mL) for both assays. With regard to the T analysis, the preincubation period was omitted. The method for analysis of E₂ differed from the T protocol published by Hahn et al. [15] only with regard to the quantity of enzyme and antibody solution (both 50 µL) and the use of E₂-specific antibody (dilution 1:1.000.000; Jenapharm, Jena, Germany) and enzyme solution (dilution 1:15.000; E2-6CMO-HRP, Technische Universität München Institute of Physiology, München, Germany). The calibration curve ranged from 5 to 160 pg/mL.

The spectral absorbance was measured at 450-nm wavelength with a VICTOR2 1420 Multilabel counter. The results of measurement were analyzed using the software WORKOUT (both PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and the respective standard curves of the assays.

Recoveries were determined (E₂: 140%; E₁S: 118%; T: 110%) for assay validation. Serially diluted specimens displayed parallelism with standard curves in all assays. The sensitivities of the assays were 3 pg/mL (E₂), 6 pg/mL (E₁S), and 9 pg/mL (T). Interassay/intraassay variations were as follows: 8%/19% (E₂), 8%/7.5% (E₁S), and 13%/6% (T).

2.4. Verification of assay results and statistical evaluation

The results of hormone analysis were related to gender-linked coloring of the hatched chicks' plumage (female: brown; male: yellow). According to the sex of the hatched chicks, samples were sorted and statistically evaluated with IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM, Chicago, IL, USA). Normal distribution was tested by means of the Kolmogorov-Smirnov test, as data were not normally distributed, the median value (mdn) as well as the 25th (P25) and 75th (P75) percentile are stated. Differences between genders were evaluated with the exact Mann-Whitney U-test. As level of significance (P), a value of $P \leq 0.01$ was used to determine statistical significance, with $P \leq 0.001$ being highly significant. Cumulative distribution was analyzed according to Kaplan-Meier. The area under the curve (AUC) with standard error (SE) and 95% confidence interval (CI) was calculated by means of receiver-operating-characteristic (ROC) analysis. To differentiate between the hormone content in the allantoic fluid of male and female embryos, a cut-off was chosen on the basis of the ROC data that maximizes sensitivity and specificity. Sensitivity and specificity are stated for this value.

3. Results

3.1. Preliminary study

It was not possible to obtain enough allantoic fluid on incubation Day 7 for analysis of all three hormones. Therefore, we refrained from assaying the allantoic fluid for E₂ on Day 7. We were able to detect E₁S and T in the allantoic fluid on all days of sampling, and E₂ was detected from Days 8 to 10 of incubation. The measured hormone values with regard to median, P25, and P75, as well as P, are given in Table 1. Briefly summarized, statistical evaluation confirmed E₂ and E₁S to be suitable hormones for sex identification, because they showed gender-related differences in hormone concentrations. In contrast, there were no observable gender distinctions for T levels on any day of sampling. Thus, analysis of the allantoic fluid concentrated on E₂ and E₁S in the main study. Due to this focus, the required amount of sample material was reduced from 50 to 20 µL.

3.2. Main study

The determined hormone levels for the respective days and genders considering median, P25, and P75, as well as P, are shown in Table 2 and are depicted in Figures 3 and 4. On Day 7, only E₁S was detectable with no significant differences in the hormone values with regard to the gender (male: mdn = 0.116 ng/mL; female: mdn = 0.132 ng/mL; $P = 0.897$). On Day 8, E₂ and E₁S were measurable, however, without displaying any significant sex differences. E₂ levels amounted up to a median of 33.1 pg/mL in males and 34.3 pg/mL in females ($P = 0.905$). For E₁S, males displayed a median hormone level of 0.126 ng/mL, and females a median value of 0.139 ng/mL ($P = 0.265$). On Day 9 of incubation, sex-related differences in the hormone content of the allantoic fluid became apparent.

Table 1

Preliminary study: E₁S, E₂, and T concentrations in the allantoic fluid on incubation Days 7 to 10 with regard to median, 25th (P25), and 75th percentile (P75), as well as level of significance.

Day	Gender	Median	P25	P75	P-value
Estrone sulfate concentration (ng/mL)					
7	Male	0.176	0.114	0.202	0.897
	Female	0.176	0.124	0.203	
8	Male	0.122	0.073	0.134	0.305
	Female	0.139	0.095	0.154	
9	Male	0.125	0.085	0.145	0.085
	Female	0.169	0.112	0.215	
10	Male	0.193	0.167	0.237	≤0.001
	Female	0.677	0.641	0.758	
Estradiol concentration (pg/mL)					
7	Male	Not measured	Not measured	Not measured	Not measured
	Female	Not measured	Not measured	Not measured	
8	Male	33.10	29.40	50.10	0.905
	Female	34.25	29.03	40.30	
9	Male	149.6	140.0	164.2	0.481
	Female	317.0	56.2	355.4	
10	Male	104.4	46.1	116.1	≤0.001
	Female	156.7	128.6	193.2	
Testosterone concentration (ng/mL)					
7	Male	0.180	0.133	0.233	0.433
	Female	0.170	0.125	0.195	
8	Male	0.205	0.185	0.355	0.356
	Female	0.195	0.155	0.260	
9	Male	0.135	0.125	0.268	0.780
	Female	0.160	0.138	0.228	
10	Male	0.170	0.165	0.210	0.885
	Female	0.180	0.155	0.245	

E₂ showed significant differences with a median value of 157.7 pg/mL in males and 329.5 pg/mL in females, and E₁S displayed highly significant differences between males (mdn = 0.110 ng/mL) and females (mdn = 0.312 ng/mL). The gender variance was even more distinct on Day 10. Both E₂ (male: mdn = 48.8 pg/mL; female: mdn = 154.0 pg/mL) and E₁S (male: mdn = 0.160 ng/mL; female: mdn = 0.678 ng/mL) showed highly significant differences between the sexes.

For both E₂ and E₁S, the cumulative distribution on Day 8 displayed identical curve progressions for male and female embryos, whereas on Days 9 and 10, discrepancies

between the sexes were noticeable (Fig. 5). ROC analysis was conducted for both hormones on Days 9 and 10. On Day 9, the AUC amounted to 0.907 (SE = 0.021, CI (0.866; 0.949)) for E₁S and 0.697 (SE = 0.074, CI (0.552; 0.842)) for E₂. The analysis for Day 10 displayed an AUC of 0.887 (E₁S; SE = 0.040, CI (0.809; 0.965)) and 0.893 (E₂; SE = 0.037, CI (0.820; 0.965)), respectively. For the identification of male embryos on Day 9 with E₁S as an endocrine marker, 0.171 ng/mL was selected as cut-off value; embryos with E₁S concentrations ≤0.171 ng/mL were categorized as male. For this classification, the analysis had a sensitivity of 86.0% and specificity of 82.9%.

Table 2

Main study: E₁S and E₂ concentrations in the allantoic fluid on incubation Days 7 to 10 with regard to median, 25th (P25), and 75th percentile (P75), as well as level of significance.

Day	Gender	Median	P25	P75	P-value
Estrone sulfate concentration (ng/mL)					
7	Male	0.116	0.082	0.018	0.897
	Female	0.132	0.071	0.188	
8	Male	0.126	0.054	0.177	0.265
	Female	0.139	0.089	0.256	
9	Male	0.110	0.071	0.152	≤0.001
	Female	0.312	0.206	0.426	
10	Male	0.160	0.140	0.228	≤0.001
	Female	0.678	0.523	0.798	
Estradiol concentration (pg/mL)					
7	Male	Not measured	Not measured	Not measured	Not measured
	Female	Not measured	Not measured	Not measured	
8	Male	33.10	29.40	50.10	0.905
	Female	34.25	29.03	40.30	
9	Male	157.7	54.4	326.8	≤0.01
	Female	329.5	215.2	370.3	
10	Male	48.80	38.70	111.6	≤0.001
	Female	154.0	120.0	194.8	

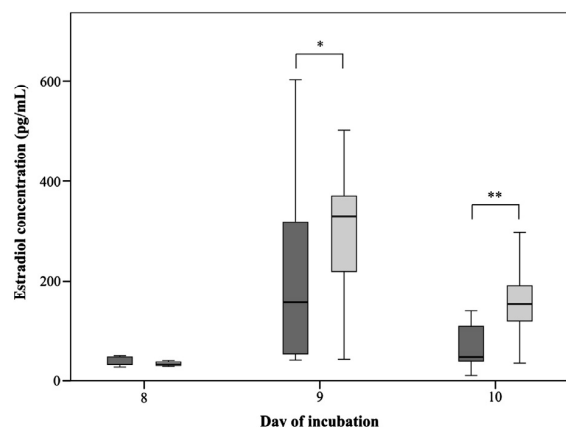


Fig. 3. Boxplot diagram of estradiol concentrations (pg/mL) of male (dark gray bar) and female (light gray bar) embryos in the allantoic fluid on incubation Days 8 to 10. Significant differences between the genders are indicated by asterisk, and highly significant distinctions by double asterisks.

The sampling of allantoic fluid led to the following decrease in hatchability for position A: 35% on Day 7 (experimental group E = 43%, control group C = 78%), 23% on Day 8 (E = 54%, C = 77%), 19% on Day 9 (E = 54%, C = 73%), and 19% on Day 10 (E = 64%, C = 83%). Embryonic death occurred in equal parts directly after specimen collection and around Day 19 of incubation. In contrast, sampling in position B did only cause a negligible reduction of hatchability compared with the control group (E = 80%, C = 81%). The quantity of withdrawn allantoic fluid had no influence on the hatching rate. Malformations of embryos or hatched chicks were observed neither in the experimental group nor in the control group.

4. Discussion

This is the first report concerning *in ovo* gender identification of domestic chicken in the first half of incubation. Our study found that the allantoic fluid is a suitable medium for detection of sex differences; moreover, the sampling in position B only has little adverse effects on the embryo. We succeeded in establishing E₁S and E₂ as endocrine markers for *in ovo* gender determination in the allantoic fluid. On the basis of these results, domestic chicken can be sexed before hatch and even before the onset of pain perception. In the following, the different hormones and methods evaluated in this study are discussed with regard to their significance, practicability, and reliability.

In the preliminary study, we aimed to identify suitable endocrine markers for gender differentiation. Free T was found in the allantoic fluid on all days of sampling, but only in very low concentrations; additionally, gender differences were nonexistent. In contrast to our results, Epplé et al. [17] were not able to detect free T in the allantoic fluid of both male and female embryos on Days 13 and 14 of incubation. The reason for the divergence might be the differences in experimental procedure. The study mentioned worked with radioimmunoassays (RIA), whereas we used an ELISA

adapted to domestic chicken. As the authors do not state data concerning sensitivity or recovery of the assay, a comparison of the methods with regard to these parameters is not possible. Nevertheless, the findings indicate that our ELISA can be considered as more sensitive than an RIA for the analysis of allantoic fluid. Moreover, we assume that T is either excreted in a conjugated form into the allantoic fluid, as reported for allantoic waste by Benowitz-Fredericks et al. [18], or is aromatized to estrogens as reported by Haffen and Cédard [19]. Further investigation of this aspect might be subject of future studies. Nevertheless, currently T does not represent a suitable marker for *in ovo* sex identification of domestic chicken embryos.

Our study found E₂ to be present in the allantoic fluid of both genders from Day 8 of embryonic development. As reported by Woods and Erton [20] via immunofluorescence of embryonic ovaries and testes, estrone and E₂ can be detected in the gonads of both male and female chicken from incubation Day 3.5. In addition to the endogenous production, maternal estrogens are deposited in the egg yolk irrespectively of the embryonic sex. These hormones are released when the embryo metabolizes the yolk [21]. Regardless of the origin, the estrogens are metabolized and excreted into the allantois afterward. Therefore, E₂ can be detected in both male and female embryos.

Gender differences in the gonadal secretion of estrone and E₂ are visible at Day 6.5 of incubation [20] and manifest in plasma-level variances on Day 7.5 [8]. In the allantoic fluid, we observed significant differences in the E₂ levels from incubation Day 9. Our study is the first report with regard to E₂ concentration in the allantoic fluid at such an early stage of incubation. Epplé et al. [17] analyzed the hormone compounds in the allantoic fluid of 13- and 14-day-old chicken embryos via RIA. They found conjugated E₂ in the allantoic fluid of female embryos, whereas free E₂ was not measurable. The allantoic fluid of male embryos did not contain any detectable estrogens; details concerning sensitivity and recovery of the assay are not given.

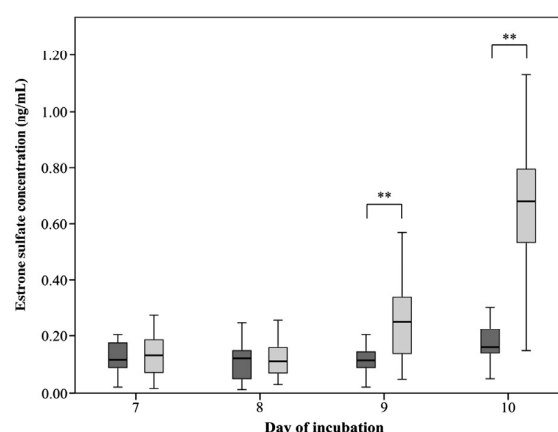


Fig. 4. Boxplot diagram of estrone sulfate concentrations (ng/mL) of male (dark gray bar) and female (light gray bar) embryos in the allantoic fluid on incubation Days 7 to 10. Highly significant distinctions are indicated by double asterisks.

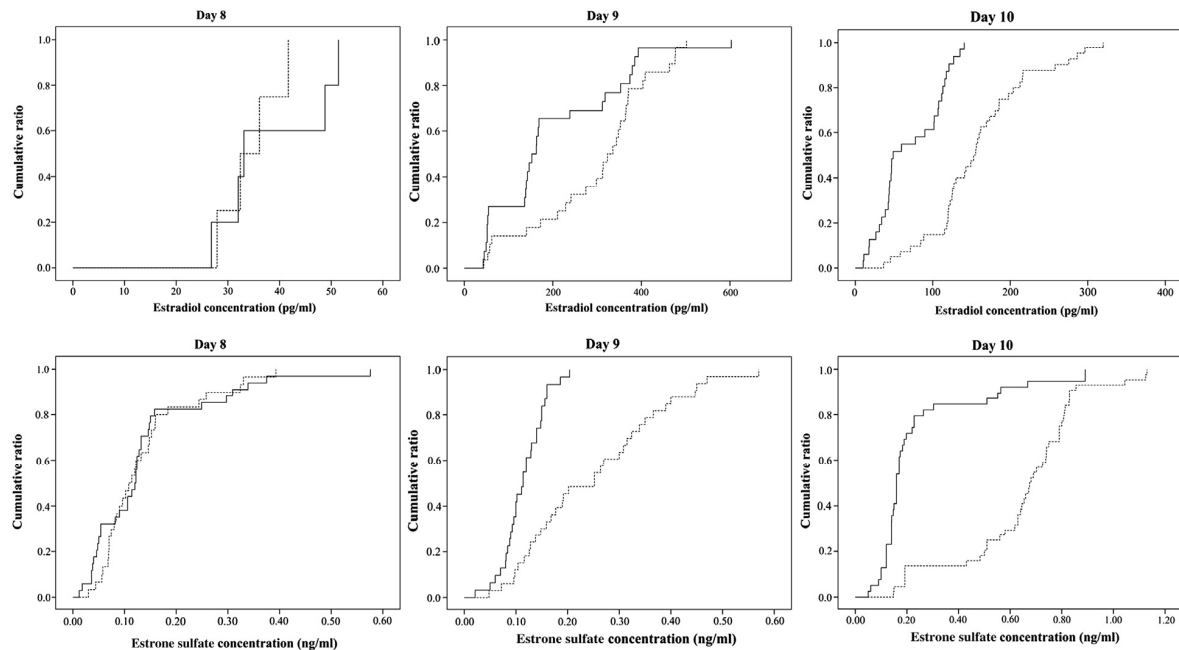


Fig. 5. Cumulative distribution for E_2 (first row) and E_1S (second row) concentrations on incubation Days 8 to 10. Male: —; female: - - -.

E_1S was measurable in the allantoic fluid of the embryos on all days of sampling. As reported for E_2 , we observed significant differences between male and female embryos from Day 9 of incubation. These findings agree only in parts with Gill et al. [11], who detected E_1S in the allantoic fluid of female embryos on Day 10 of incubation onward via RIA; for male embryos, the hormone level was not verifiable. The reason for the disagreeing results can be the different analysis methods (RIA vs. ELISA), as discussed above for T. The authors state a sensitivity of 25.1 pg/mL for E_1S , whereas our assay showed a sensitivity of 6 pg/mL; therefore, our ELISA adapted to domestic chicken can be considered a more sensitive method with regard to E_1S .

On Day 9 of incubation, the hormone values for E_1S showed more pronounced gender differences than those measured for E_2 . As the allantois represents a repository for the waste products of the embryonic kidneys [12], only a small fraction of estrogens are excreted as biologically active E_2 . The main excretion products are conjugated estrogens, such as E_1S . The conversion into the biologically inactive form is a method to prevent the overexposure of the embryo to adverse effects of high hormone levels [11].

Using the methods described in our study, E_1S is preferred as an excellent indicator for gender identification in our study despite of the significant results detected for E_2 on Day 9. First, the sample preparation routine and analysis for E_1S is less time-consuming. Thus, E_1S represents the more practical marker for large-scale usage. Second, the differences in hormone levels show a higher significance value on Day 9 of incubation. ROC analysis confirmed that E_1S is a more reliable marker for gender identification on

Day 9 than E_2 . Due to a larger variation of assay results, E_2 can only be used on Day 10. Taking into account the time needed for the analysis, reliable results for sexing cannot be obtained before the onset of pain perception when using E_2 as endocrine marker.

Studies report a method for *in ovo* gender identification via analysis of allantoic fluid on Day 17 of incubation. Conjugated estrogens are enzymatically cleaved and the produced E_2 is detected with the help of an estrogen receptor and an estrogen inducible reporter gene [14,22]. Although the implementation of this method would mean an improvement compared with killing the day-old chicks, an animal welfare problem still arises considering the late stage in embryonic development. Avian embryos have evolved a functional brain by Day 10.5 of incubation, and “must be destroyed humanely as they may be capable of perceiving pain from that stage” [23]. The gender identification at a very early stage during embryonic development, even before the onset of pain perception, is a major advantage of our method.

For sampling of the allantoic fluid, two different egg positions were evaluated. In position A, the eggs displayed the highest hatching rates on Days 9 and 10. Embryonic death occurred either directly after sampling or around Day 19 of incubation. A previous publication documented the mortality rates occurring throughout incubation for common pigeons and ring doves. The findings show a clustering of embryonic death during early incubation [24]. With regard to the interpretation of Hamilton [25], we conclude that the reason for the increased death rates on Days 7 and 8 observed in our study is the more pronounced

sensitivity of the avian embryo in early development; the chicken embryo responds more delicately to manipulation on Days 7 and 8 than on Days 9 and 10. The fact that Riddle [24] also observed a higher mortality of avian embryos directly before hatch indicates that the sampling procedure is in all probability not the reason for embryonic death around Day 19, as it can also be found in natural brooding.

Although being of similar reliability with regard to specimen collection as position A, position B resulted in higher hatching rates that only differed negligible from the control group. Because of tilting the egg, the subsequent pooling of the allantois takes place in a more defined area. The embryo is not situated as close to the eggshell as in position A and it is better protected against external influences, such as perforation of the eggshell or sampling. Therefore, this position should be preferred for sampling.

In summary, we were able to establish a method for sorting domestic chicken eggs according to their gender on Day 9 of incubation by analysis of the allantoic fluid via E₁S ELISA. The described method allows an elimination of eggs containing male embryos already before the onset of pain perception. Therefore, the destruction of eggs containing male embryos directly after sex determination is not painful for the embryo. This benefit in animal welfare is a great improvement compared with the current practice of culling male day-old chicks. In addition, the economic efficiency of hatcheries is also improved. Manual sexing can be omitted due to automated gender identification, and breeding efficiency is enhanced by early elimination of eggs containing male embryos.

Acknowledgments

This study was supported by the German Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grants nos. 511-06.01-28-1-33.010-07 and 511-06.01-28-1-33.025-07. We gratefully acknowledge the Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany) for providing the eggs and incubators used in this study as well as their helpful advice. The authors thank Susanne Tätzner for her technical assistance.

References

- [1] Klein S, Flock D, Ellendorff F. Management of newly hatched male layer chicks—current knowledge on sex determination and sex diagnosis in chicken: potential solutions. *Worlds Poult Sci J* 2003; 59:62–4.
- [2] Austrian National Council. Bundesgesetz über den Schutz der Tiere: TSchG; 2004.
- [3] German Federal Parliament. Tierschutzgesetz: TierSchG; 2006.
- [4] Steiner G, Bartels T, Stelling A, Krautwald-Junghanns M, Fuhrmann H, Sablinskas V, et al. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:2775–82.
- [5] Petitte JN, Kegelmeyer AE. Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim Biotechnol* 1995;6:119–30.
- [6] Arnold KE, Orr KJ, Griffiths R. Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. *Mol Ecol* 2003;12:3451–8.
- [7] Woods JE, Simpson RM, Moore PL. Plasma testosterone levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1975;27:543–7.
- [8] Woods JE, Brazzill DM. Plasma 17-beta-estradiol levels in the chick-embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1981;44:37–43.
- [9] Dutton CJ, Tieber A. A modified protocol for sex identification of in ovo avian embryos and its application as a management tool for endangered species conservation programs. *J Zoo Wildl Med* 2001; 32:176–80.
- [10] Jensen T, Mace M, Durrant B. Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. *Z Biol* 2011;30:1–11.
- [11] Gill DV, Robertson HA, Betz TW. In vivo estrogen synthesis by the developing chicken (*Gallus gallus*) embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1983;49:176–86.
- [12] Romanoff AL. The avian embryo: structural and functional development. New York: Macmillan; 1960.
- [13] Tierzucht Lohmann. Management guide hatchery. Cuxhaven: Lohmann Tierzucht GmbH; 2011.
- [14] Phelps P, Bhutata A, Bryan S, Chalker A, Ferrell B, Neuman S, et al. Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *Worlds Poult Sci J* 2003;59:33–8.
- [15] Hahn A, Reitemeier S, Gottschalk J, Haense M, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K, et al. Assessment of the male reproductive status in Psittaciformes by endocrine analysis. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 2011;39:249–57.
- [16] Volkery J, Gottschalk J, Sobiraj A, Wittek T, Einspanier A. Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis. *Vet Rec* 2012; 171:195.
- [17] Epple A, Gower B, ten Busch M, Gill T, Milakofsky L, Piechotta R, et al. Stress responses in avian embryos. *Am Zool* 1997;37:536–45.
- [18] Benowitz-Fredericks ZM, Kitaysky AS, Wingfield JC. Steroids in allantoic waste: an integrated measure of steroid exposure in ovo. *Ann NY Acad Sci* 2005;1046:204–13.
- [19] Haffen K, Cédard L. Etude, en culture organotypique in vitro, du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 1968;11:220–34.
- [20] Woods JE, Erton LH. The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1978;36:360–70.
- [21] Petrie M, Schwabl H, Brande-Lavridsen N, Burke T. Maternal investment: sex differences in avian yolk hormone levels. *Nature* 2001;412:498–9.
- [22] Tran HT, Ferrell W, Butt TR. An estrogen sensor for poultry sex sorting. *J Anim Sci* 2010;88:1358–64.
- [23] Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim* 1997;31:1–32.
- [24] Riddle O. Studies on the physiology of reproduction in birds. XXVII: the age distribution of mortality in bird embryos and its probable significance. *Am J Phys* 1930;94:535–47.
- [25] Hamilton HL. Sensitive periods during development. *Ann NY Acad Sci* 1952;55:177–87.

3.2 Publikation 2

Anne Weissmann, Anke Förster, Jutta Gottschalk, Susanne Reitemeier, Maria-Elisabeth Krautwals-Junghanns, Rudolf Preisinger, Almuth Einspanier

In ovo-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance

European Poultry Science. 2014; 78; DOI 10.1399/eps.2014.25.

***In ovo*-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance**

***In ovo*-Geschlechtsbestimmung bei Legehybriden: Einfluss auf Schlupf und Produktionsleistung**

Anne Weissmann¹, Anke Förster², Jutta Gottschalk¹, Susanne Reitemeier¹, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns³, R. Preisinger² and Almuth Einspanier¹

¹ Institute of Physiological Chemistry, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Germany

² Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Germany

³ Clinic for Birds and Reptiles, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Germany

Correspondence: Einspanier@vetmed.uni-leipzig.de

Manuscript received 11 November 2013, accepted 10 January 2014

Introduction

The culling of day-old male chicks from layer strains is a much regarded topic in today's politics. Although being legitimate, discussions arise because millions of healthy animals are killed each year. Different alternatives to this animal welfare problem were tested in the recent past: rearing of a dual purpose breed, fattening of male layer hybrids and *in ovo*-sex identification.

First option is the usage of a dual purpose strain, where males are bred for fattening and females for laying. For this approach it has to be noted that reproduction and growth performance in chicken are negatively correlated. The selection for growth efficiency in broiler strains has resulted in negative effects concerning several reproduction traits, such as reduction of fertility and a higher percentage of defective eggs (RAUW et al., 1998). Chicken bred for egg production on the other hand have a higher feed-conversion index combined with a lower carcass weight (DAMME and RISTIC, 2003). Consequently, their fattening performance is less profitable than in broilers. Chicken reared for both fattening and egg production will never reach the efficiency of specialised strains (ICKEN et al., 2013; SONDER, 2012). At the moment, dual purpose breeds cannot be seen as an alternative to the highly specialised broiler and layer strains from an economic point of view.

The rearing and fattening of male layers is a second alternative and has been evaluated under common as well as extensive production conditions. The egg type-cockerels were not able to compete with commercial broilers regarding feed conversion and carcass composition. Nevertheless, the differences between the strains became less pronounced under the extensive conditions (GERKEN et al., 2003). KOENIG et al. (2012) demonstrated that rearing male layers as coquelets improves the fattening performance and thus increases economic efficiency. However, the genotype was the most determining factor regarding growth performance and carcass quality; therefore, it can be presumed that this method cannot be applied to all layer strains.

A third option to evade culling day-old chicks is sexing before hatch. Different methods are reported with regard to time and type of sex identification. For the fertilised, not incubated chicken egg two techniques are described. On the one hand, STEINER et al. (2011) demonstrated the detection of sex differences in blastoderm cells via infrared spectroscopic imaging. On the other hand, the analysis of embryonic cell material by polymerase chain reaction for female specific gene sequences is reported (ARNOLD et al., 2003; PETITTE and KEGELMEYER, 1995). So far, all of these methods have only been tested under laboratory conditions.

In incubated eggs gender identification is based upon differences in the hormone production of embryonic male and female gonads. These variances in sexual steroid levels can be measured in the blood plasma from day 7.5 of incubation onward (WOODS et al., 1975; WOODS and BRAZZILL, 1981). The problem that precludes practical implementation in hatcheries is the individual localisation of embryonic blood vessels (DUTTON and TIEBER, 2001; JENSEN et al., 2011). So far, a standardised, minimally invasive blood sampling procedure has not been developed.

The embryonic sex hormones are excreted into the allantoic fluid, the embryonic urine, where the gender variances can be measured as well. Previous publications report a method for sex identification by analysis of the allantoic fluid for oestrogens on day 17 of incubation. The easy accessibility of the allantois combined with the negligible influence of sampling on hatch is advantageous for practical implementation of this method (PHELPS et al., 2003; TRAN et al., 2010). Considering animal welfare, the major problem is the time of gender identification. Chicken embryos develop pain perception after the first half of incubation (CLOSE et al., 1997). Therefore, an *in ovo*-gender identification followed by an elimination of the male embryos before day 10.5 is desirable. We previously described a method for endocrine *in ovo*-sexing of domestic chicken via analysis of allantoic fluid from incubation day 9 onward. By measurement of oestrone sulphate we were able to determine the embryonic sex with a sensitivity of 86% and specificity of 83% (WEISSMANN et al., 2013).

In this study, a large scale production trial of *in ovo*-gender identification via endocrine analysis is reported. On day 8 + 4 h and 9 + 4 h of incubation the allantoic fluid of layers' eggs was assayed for oestrone sulphate. The eggs were classified according to the measured hormone levels, using a pre-defined cut-off value determined by statistical analysis. Furthermore, the impact of the sampling procedure on hatching, rearing and production performance was analysed.

Material and Methods

This study comprises a preliminary and a main study exploring endocrine gender identification of layers via analysis of the allantoic fluid for oestrone sulphate (E₁S). The experiments were conducted successively under the same surrounding conditions in a commercial hatchery. A total of 10.678 layers' eggs (Lohmann Brown (LB) and Lohmann Selected Leghorn (LSL), Lohmann Tierzucht GmbH, Germany), divided up into an experimental (n = 5420) and a control group (n = 5258), were used. In the preliminary study a total of 1220 eggs (LB) were sampled on incubation day 8 + 4 h. In the main study, the allantoic fluid was withdrawn on incubation day 8 + 4 h (n = 1200, LB) or 9 + 4 h (LB n = 2850, LSL n = 150).

Incubation and hatching regime

Incubation took place at 37.8°C and 55% humidity with full automatic turning (setter: EMKA VH-96, EMKA incubators, Belgium; hatcher: Petersime Model 96, Petersime nv, Belgium). Sampling of the allantoic fluid was conducted as previously described (WEISSMANN et al., 2013). The egg was placed in a 45° angle and the shell was perforated 0.5 cm next to the air chamber. Subsequently, 25–100 µl allantoic fluid was withdrawn. Afterwards, experimental and control eggs were placed alternately on the setter trays. In the preliminary study, the chicken hatched in groups of 38–56 per tray, sorted according to the gender determined via endocrine analysis. For the main study, the eggs were placed in trays (day 8 + 4 h) or individually (day 9 + 4 h) during hatch.

Hormone analysis

The sex of the embryos was determined via hormone analysis. The allantoic fluid was assayed for E₁S with a sensitive competitive enzyme immunoassay following the protocol previously described (WEISSMANN et al., 2013).

The allantoic fluid was diluted with buffer (7.12 g sodium hydrogen phosphate (Merck, Germany), 8.5 g sodium chloride (Merck, Germany), 1.0 g bovine serum albumin (Serva, Germany) ad 1000 ml ddH₂O, pH 7.2) and deep frozen (-80°C) until analysis. For the assay 96 well plates (Nunc A/S, Denmark), coated with Sheep-Anti-Rabbit IgG (dilution 1:100, Institute of Physiology, Weißenstephan, TU München, Germany) were used. The analysis was performed following the protocol previously described for E₁S (WEISSMANN et al., 2013). Hormone values were analysed as single (preliminary study) or double determination (main study). Assay validation resulted in the following: sensitivity 6 pg/ml, recovery 118%, inter-/intra- assay variation 4.9%/7.5%.

Rearing and production performance

After hatch, a total of 150 hens of the experimental and 80 hens of the control group were reared in a confinement housing system. To analyse the possible influence of allantoic fluid sampling on performance characteristics, mortality and chick weight were recorded at week 2, 4 and 6 during the rearing period of 17 weeks. At the age of 18 weeks, one control and two experimental groups of 60 birds each were placed for production period in floor pens at the University of Bonn, Germany. Mortality and egg production were monitored daily up to the age of 33 weeks. Feed consumption per hen was determined from week 21 to 32. Body weight was recorded at the age of 33 weeks; egg weight was assessed on three consecutive days during week 33. Hatchery and rearing facility were provided by the Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany), the production facility was provided by the testing station of the University of Bonn, Frankenforst, Germany.

Statistics

All data was analysed with IBM® SPSS® Statistics Version 20 (IBM, USA); a value of $P \leq 0.05$ was determined as level of significance.

Endocrine sexing was conducted using statistically predetermined boundary values; embryos with E_1S levels below this limit were classified as males. For 8d + 4 h old chicken embryos, a value of 0.176 ng/ml E_1S was used (WEISSMANN et al., 2013). For 9d + 4 h embryos a new limit was calculated by using a Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-analysis of $n = 500$ samples. The area under the curve (AUC) with standard error (SE) and 95% confidence interval (CI) was calculated. Based on this analysis, a cut off that maximises sensitivity and specificity was determined. The categorization of the embryos according to the measured level of E_1S was cross-checked via colour and feather sexing of the day-old chicks.

Gender and weight at hatch was surveyed for both experimental and control group; only hatched chicks were included in the statistical analysis. For the hatching weight, mean value (mean) \pm standard deviation (SD) was calculated for all respective groups. Significant differences between control and experimental group as well as between the genders were analysed with the t-test for independent samples. Furthermore, the overall hatchability rate and accuracy of gender prediction was determined. With the help of the Pearson product-moment correlation coefficient (Pearson's r) the influence of sampled allantoic fluid volume on hatching performance was analysed.

During the rearing period, the mean weight \pm SD as well as the coefficient of variation (COV) and body weight uniformity were calculated. Laying performance was determined as the percentage of eggs per housed hen per day. For the characterization of the hens' egg production the following ages were assessed: beginning of egg production (egg production $\geq 10\%$), 50% of egg production, beginning of peak production (egg production $\geq 92\%$). From the beginning of peak production up to 33 weeks of age, the mean laying performance was calculated. Feed consumption was tested with the Mann Whitney U-test for significant differences between the groups.

Egg weight and hens' body weight are given as mean \pm SD and were tested with the t-test for independent samples to assess significant differences between experimental and control groups.

Results

Preliminary study

The preliminary study was conducted to test the on-site logistics as well as calibrate the methods of specimen collection and analysis to the quantity of sampled eggs.

The gender of the day 8 + 4 h old embryos was identified using the given limit value of 0.176 ng/ml E_1S . The prognosis was correct for 70.4% of male and 77.6% of female chicken. The hatching rate was reduced by 4.6 points of percentage compared to the control group (experimental group E = 88.6%, control group C = 93.2%). As these results lagged behind the expected results of accurate sex prediction, the experimental procedure was adjusted for the main study. First, the amount of withdrawn allantoic fluid was increased to allow a double determination of the E_1S concentration. Second, handling and storage during sampling were improved.

Main study

To provide a comprehensive overview the major findings of the main study are depicted in Table 1. For day 8 + 4 h old embryos the following results were obtained: the overall accuracy of gender prediction was 83.5% (males: 78.8%, females: 89.9%), hatchability was reduced by 1.4 points of percentage (E = 87.8%, C = 89.2%).

ERGEBNISSE

Europ. Poult. Sci., 78, 2014, ISSN 0003-9098, © Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. DOI: 10.1399/eps.2014.25

Table 1. *In ovo*-sexing accuracy, hatchability and hatching weight results for LB and LSL layers.

Genauigkeit der *in ovo*-Geschlechtsbestimmung, Schlupfrate und Schlupfgewichte für LB und LSL Legehybride.

Genotype (age)	Sexing Accuracy	Hatchability		Hatching Weight	
		Trial	Control	Male	Female
LB (d8 + 4 h)	83.5%	87.8%	89.2%	38.1 ± 3.25g	37.6 ± 3.01g
LB (d9 + 4 h)	98.7%	90.1%	93.6%	38.5 ± 3.03g	37.4 ± 2.86g
LSL (d9 + 4 h)	100%	81.3%	94.0%	37.2 ± 3.17g	37.0 ± 2.71g

LB = Lohmann brown, LSL = Lohmann Selected Leghorn, d = day, h = hour.

For embryos on day 9 + 4 h, a separate limit value was calculated. ROC analysis of n = 500 allantoic fluid samples resulted in an AUC of 0.974 (SE 0.009, CI (0.957; 0.991); see Figure 1). As boundary value a hormone level of 0.265 ng/ml E₁S was established. Embryos with an E₁S concentration below this limit were categorized as males. The value has a sensitivity of 98.2% and a specificity of 96.6% for the correct identification of male embryos. Using this limit value the male and female embryonic gender was correctly determined for 98.7% LB and 100% LSL.

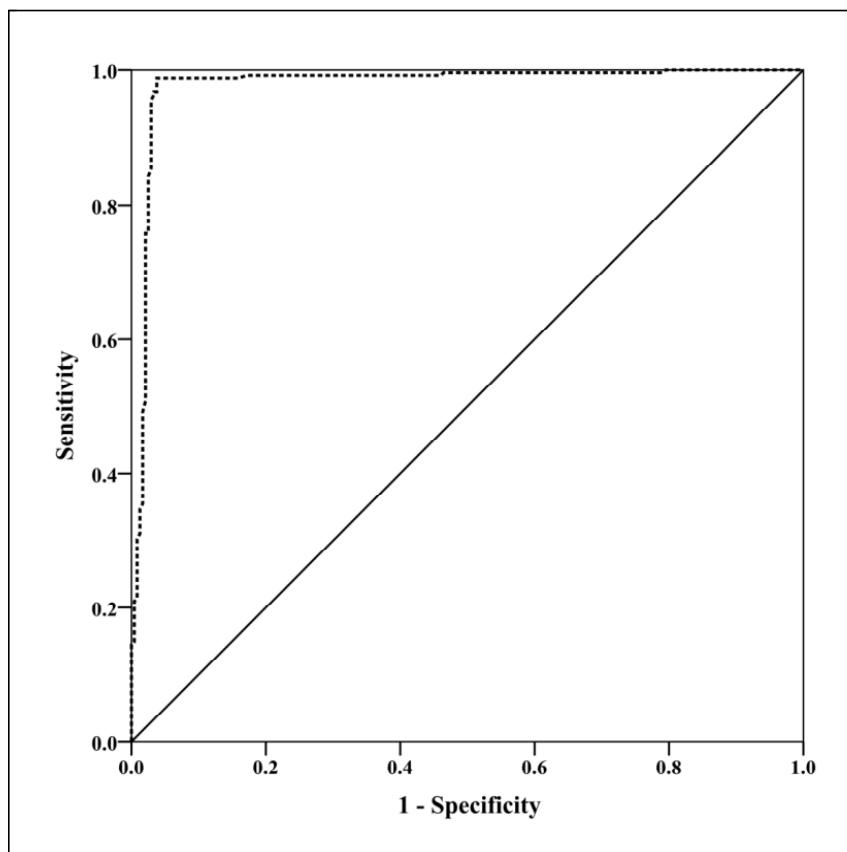


Figure 1. Receiver-Operating-Characteristics curve for the correct identification of male embryos on incubation day 9 + 4 h.

Grenzwertoptimierungskurve für die korrekte Identifizierung von männlichen Embryonen an Tag 9 + 4 h der Inkubation.

Sampling of allantoic fluid reduced hatchability by 3.5 points of percentage in LB (E = 90.1%, C = 93.6%) and 12.7 points of percentage in LSL (E = 81.3%, C = 94.0%). Statistical analysis showed no correlation between the amount of withdrawn fluid and the hatching results (Pearson's $r=0.002$, $P > 0.05$).

The results for the evaluation of hatching weights are shown in Table 1. Males had the following average weights: LB day 8 + 4h: $38.1\text{g} \pm 3.25\text{g}$, LB day 9 + 4h: $38.5\text{g} \pm 3.03\text{g}$ and LSL day 9 + 4h: $37.2\text{g} \pm 3.17\text{g}$. The observed average weights for female day-old chicks are stated below: LB day 8 + 4h: $37.6\text{g} \pm 3.01\text{g}$, LB day 9 + 4h: $37.4\text{g} \pm 2.86\text{g}$, LSL day 9 + 4h: $37.0\text{g} \pm 2.71\text{g}$. On day 8 + 4 h neither the female nor the male chickens' weight at hatch differed significantly between the control and the experimental group (t-test; $P > 0.05$). For LB eggs sampled on day 9 + 4 h, the mean hatching weights of both male and female chicks displayed by 0.24 g higher weights in the control group (t-test, $P = 0.03$). Gender distinctions in hatching weights were significant in all LB groups (t-test, $P < 0.05$). For LSL chicks the mean weight did not show significant differences between the sexes (t-test, $P = 0.74$).

Post hatching performance

The chickens of both experimental and control group were weighted during the rearing period in weeks 2, 4 and 6 post hatching; the results are displayed in Table 2. The mean body weight \pm SD were as follows: 2 weeks: $140\text{g} \pm 12\text{g}$ (E), $142\text{g} \pm 13\text{g}$ (C); 4 weeks: $288\text{g} \pm 28\text{g}$ (E), $299\text{g} \pm 28\text{g}$ (C); 6 weeks: $513\text{g} \pm 60\text{g}$ (E), $543\text{g} \pm 50\text{g}$ (C). Significant differences in the body weight were observed in week 4 ($P < 0.01$) and 6 ($P < 0.001$). In week 6, five birds of the experimental group had a body weight below 400 g. As one bird per group died during the rearing period, mortality was 0.007% in the experimental and 0.013% in the control group.

Table 2. Rearing performance of female LB hybrids after allantoic fluid sampling on incubation day 8 + 4 h.

Gewichtszunahmen während der Aufzucht von weiblichen LB Legehybriden nach der Entnahme von Allantoisflüssigkeit an Tag 8 + 4 h der Inkubation.

Age	Group	n	Weight		Uniformity
			Mean \pm Std.	COV	
2 weeks	E	150	$140 \pm 12\text{g}$	9	85%
	C	79	$142 \pm 13\text{g}$	9	76%
4 weeks	E	149	$288 \pm 28\text{g}$	10	72%
	C	79	$299 \pm 28\text{g}$	9	75%
6 weeks	E	149	$514 \pm 60\text{g}$	12	66%
	C	79	$543 \pm 50\text{g}$	9	81%

E = Experimental group, C = Control group. Weight is given in mean value \pm standard deviation; COV = Coefficient of Variation

The laying performance curve progressed similarly in the experimental and control group and is displayed in Figure 2. The onset of egg production was identical in all groups at 20 weeks of age. The experimental groups reached 50% of egg production at the age of 147 and 143 days respectively (mean: 145d), the control group at the age of 145 days. A peak production of 92% or higher was achieved in the experimental groups from day 153 and 151, in the control group from day 153 onward. The mean laying performance evaluated from peak production to 33 weeks of age was 93.9% in the experimental and 92.4% in the control group.

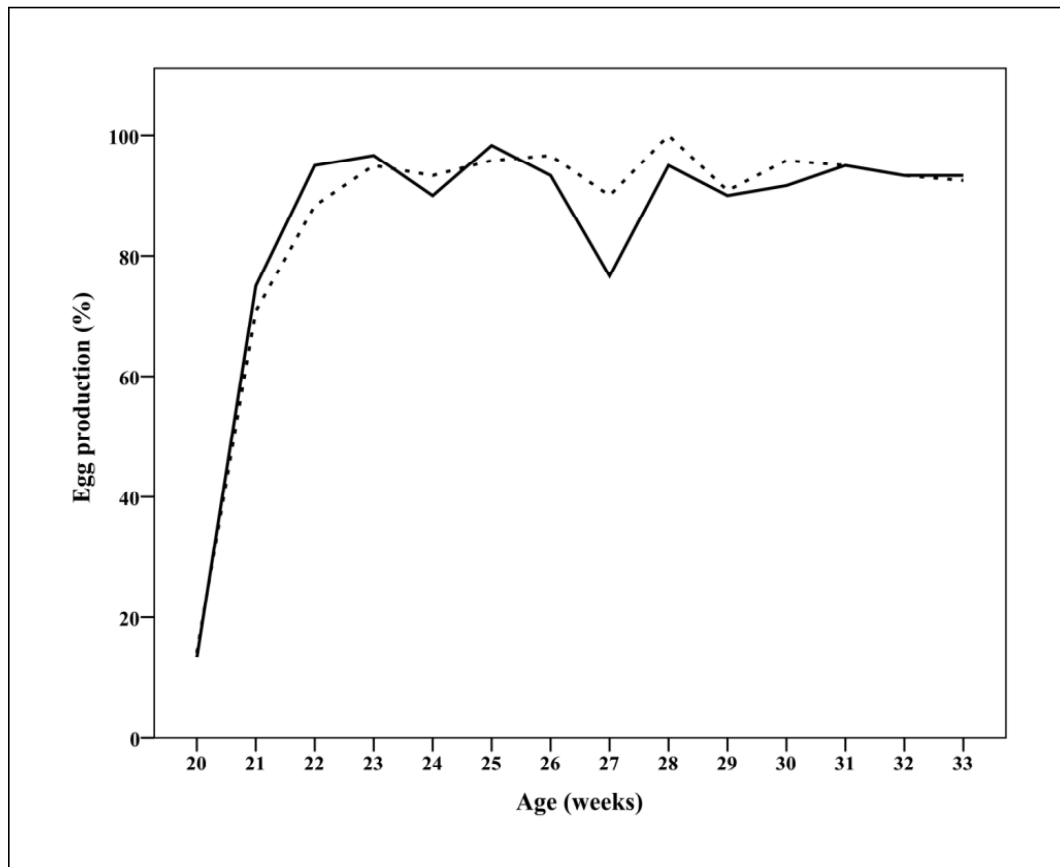


Figure 2. Comparative laying performance curves for the experimental (- - - , n = 120) and control group (— , n = 60) from weeks 20 to 33. The percentage of daily egg production was calculated as eggs per housed hen per day.

Legeleistungskurven der Versuchs- (- - - , n = 120) und Kontrollgruppe (— , n = 60) von Lebenswoche 20 bis 33. Die tägliche Legeleistung wurde prozentual in ein Verhältnis zur Anfangshennenzahl gesetzt.

The hens feed consumption per day is pictured in Figure 3. It ranged from 111 g to 132 g and did not differ between experimental and control group (Mann Whitney U-test, $P > 0.05$). Egg weight was assessed in week 33 and the average weight per group calculated. No significant differences could be observed between all groups (t-test, $P > 0.05$). The mean egg weight averaged at $63.4\text{ g} \pm 4.38\text{ g}$ (E) and $63.3\text{ g} \pm 4.34\text{ g}$ (C).

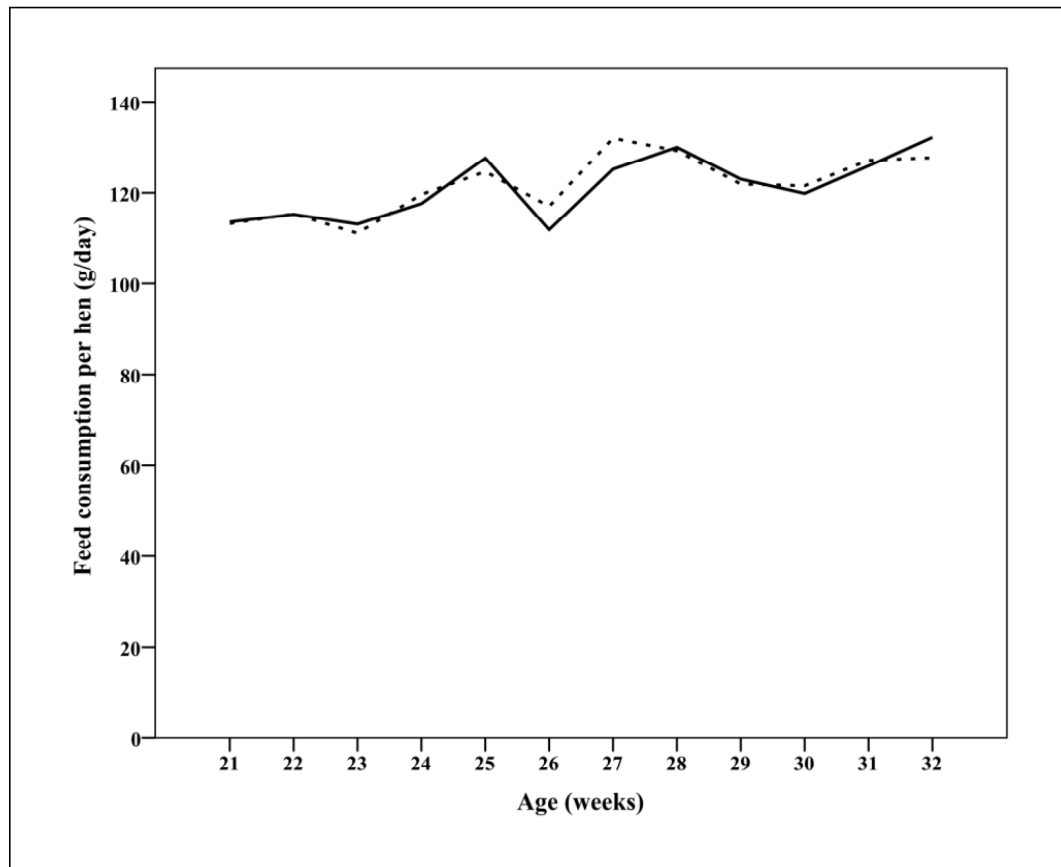


Figure 3. Feed consumption per hen (g/day) for the experimental (- - - , n = 120) and control group (— , n = 60) from weeks 21 to 32.

Futtermittelverbrauch pro Henne (g/Tag) der Versuchs- (- - - , n = 120) und Kontrollgruppe (— , n = 60) von Lebenswoche 21 bis 32.

The live weight of the hens was surveyed in week 33. No significant differences between the groups were perceived (t-test, $P > 0.05$). Hens of the experimental group had a mean body weight of $1965\text{g} \pm 127\text{g}$, those of the control group averaged at $1979\text{g} \pm 140\text{g}$. One hen per group died during the production period; this resulted in a mortality of 0.008% (E) and 0.017% (C).

Discussion

In this study, a previously published method for *in ovo*-sexing of domestic chicken was tested on a large-scale basis in a commercial hatchery. Furthermore, the effects of the technique on chick health, growth and production performance were analysed.

For day 8 + 4 h old embryos, the gender was predicted correctly in an average of 83.5%. On day 9 + 4 h, the ratio of accurate sexing increased up to 98.7% in LB. A test study using LSL eggs (n = 150) on day 9 + 4 h resulted in 100% correctly identified chicken. Current methods to identify the gender of day-old chicks are colour-, feather- and vent-sexing. Depending on chicken strain, method and expertise of the staff, accuracy of sexing ranges from 95% to 99% (BIEDERMAN and SHIFFRAR, 1987; DAKPOGAN et al., 2012; LEESON and SUMMERS, 2009; ROITER et al., 2011; SILVERUDD, 1978). This precision level can be attained in part by the results observed in this study. In our previous publication the gender of embryos on incubation day 9 was statistically predicted correctly with a sensitivity of 86% and a specificity of 83% (WEISSMANN et al., 2013). The findings of the present large scale study confirm these results for day 8 + 4 h old embryos. Nevertheless, compared to the current methods of sexing day-old chicks, the quota of correctly identified chicken is too low to allow an economic implementation in commercial hatcheries. The predictive accuracy of over 98%

for *in ovo*-sexing on day 9 + 4 h on the other hand is well capable of competing with current standards, being as accurate as sexing methods after hatch.

For day 9 + 4 h embryos, we established a new E₁S limit value; basis for computation were hormone concentrations measured in brown layers. The limit value cannot necessarily be transferred to other layer strains, because chicken populations and breeds diversify in their genetic structure (BODZSAR et al., 2009; GRANEVITZE et al., 2009). Therefore, differences regarding the allantoic hormone concentrations seem possible. In this study we were able to apply the limit value of LB layers to LSL layers with a very high accuracy. Thus it seems likely that this value can also be used for other layer strains, because the metabolism of oestrogens as well as the excretion patterns of oestrone sulphate are evolutionary highly conserved (FREEMAN and VINCE, 1974; HELDMAIER and NEUWEILER, 2003; URICH, 1994). Nevertheless is this hypothesis in need of further evaluation.

Sampling of allantoic fluid reduced hatching rates of the experimental group by 1.4 (day 8 + 4 h, LB), 3.5 (day 9 + 4 h, LB) and 12.7 points of percentage (day 9 + 4 h, LSL). During incubation, chicken embryos are very sensible to various factors, such as temperature, humidity and mechanical damage. Adverse effects on any organic system or physiological process can lead to embryo mortality (HAMILTON, 1952). Thus, it is explicable that even the slightest increase in stress inflicted on the embryo (e.g. by the sampling procedure) has adverse effects on embryonic viability. In our previous publication we observed a decrease in hatchability of about one point of percentage in LB for sampling in a 45° positioning (WEISSMANN et al., 2013). The considerably larger number of eggs included in this study (n = 5420 vs. n = 750) plus the fact that all samples were withdrawn manually is most likely the reason for the more pronounced reduction in the hatching rate. The next step in implementation of our method would be the development of a mechanical device for standardized allantoic fluid withdrawal. It can be assumed that once the procedure is automated hatching rates only differ marginally from control eggs.

For gender analysis, 25 to 100 µl allantoic fluid were sampled from each egg. One might suppose that the water loss due to the sampling of allantoic fluid is another cause for the slightly reduced hatchability in the experimental group; the embryo conserves water during incubation by reabsorbing the liquid content of the allantois in order to ensure an evened water balance and thus a successful hatch (FREEMAN and VINCE, 1974). Nevertheless, no statistical correlation was observed between the withdrawn volume and the hatching results. Hence it can be assumed that the said volume is of no consequence to the embryo considering the total quantity of excreted allantoic fluid, which reaches a maximum of about 7 ml on day 13 of incubation (ROMANOFF, 1960).

Chicken weights at hatch did only differ minimally between the experimental and the control group. In the LB strain there was a tendency of male chicks to be slightly heavier than the females. For chicken this phenomenon was first observed by BURKE and SHARP (1989). They demonstrated that gender differences in body weights appear as early as day 11 of incubation, with males being significantly heavier than females. Thus, our observations most likely represent a physiological occurring sex dimorphism and are not due to the sampling of allantoic fluid.

To rule out potential influences of allantoic fluid withdrawal on the brought up hens, the performance characteristics of hens from the experimental group were evaluated and compared to those of a control group. During the rearing period, weight gains were good in both groups and mortality was low. Nevertheless, we observed differences in body weight between the experimental and the control group in week 4 and 6. Uniformity was similar during weeks 2 and 4, but in week 6 it was by 15 points of percentage lower in the experimental group. It was noticeable that 5 animals of the experimental group lagged behind substantially in their growth (< 400 g) in week 6, which explains the overall lower mean body weight for this group. The chicks were randomly selected after hatch and group size was limited. The higher rate of outliers in the experimental group could either be an incidental finding or due to the allantoic fluid sampling; therefore this finding needs clarification by repetition of the trial with a larger flock size.

The production performance of both the experimental and the control group was very similar for all monitored parameters. Average egg weight as well as the bodyweight of the hens at week 33 did not show significant differences; the same applies to the feed consumption. Only the mean laying performance from the onset of peak production onward differed by about one point of percentage; but this observation is most likely an incidental finding due to the smaller flock size of the control group and of no significant relevance. Up to the age of 33 weeks the sampling of the allantoic fluid therefore does not have any negative impact on laying performance, feed consumption, egg weight and adult live weight. It is very likely that these observations also apply to the remaining production period, although this hypothesis needs further evaluation.

Next to a negligible influence on the embryo and grown chicken, the cost effectiveness of the method is a main criterion for the applicability of *in ovo*-sexing in hatcheries. An in-house analysis showed that the costs of the assay system used in this study amount up to 12 cents per egg, not taking into account costs for labour as well as required sampling and

diagnostic devices. Expenses were calculated on the analysis of 1000 eggs; regarding the assay components it can be assumed that the price per egg declines when all components are purchased in bulk quantities. The implementation of a new sexing method in commercial poultry production will only occur when expenses do not exceed those of current procedures for gender identification. Using *in ovo*-gender identification, sexing of day-old chicks can be omitted and the related costs saved (1.5 to 4.5 cent per animal, depending on method of sexing). Furthermore, an elimination of male embryos before hatch results in a reduction of incubation costs. Sexing at transfer cuts back expenses by 14% (SEEMANN, 2003). When the point of eliminating male embryos is moved forward to day 9 + 4 h of incubation, the saving potential is therefore considerably higher. Our medium-term goal is the development of an analysis system where additional expenditures and savings compensate each other.

Conclusion

This study demonstrates that we successfully established an accurate method for *in ovo*-sexing of layers on day 9 + 4 h of incubation via analysis of the allantoic fluid for oestrone sulphate. At this point in embryonic development the pain perception is not yet developed. In addition, the method outlined above is not limited to a certain layer strain and has little to none adverse effects on embryonic development, rearing as well as production performance of the hens. Therefore, the described technique fulfils all the basic requirements for an alternative method to the culling of day-old male layer chicks. Only the reduction of the hatching rate due to the sampling of allantoic fluid needs further investigations and/or the development of an alternative sampling method. Additional research is necessary to develop a technical device for practical implementation in hatcheries, which enables a reliable as well as cost-efficient *in ovo*-sexing.

Acknowledgements

This project was funded by the German Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant no. 511-06.01-28-1-33.025-07. We gratefully acknowledge the Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany) for supporting this study. The authors thank Ms. Stefanie Trinkies, Ms. Ana Blanco, Ms. Vicki Bachner and Ms. Susanne Tätzner for their technical assistance.

Summary

The culling of male day-old chicks from layer strains is an ethically questionable procedure and therefore requires the exploration of alternatives. We previously described a method for endocrine *in ovo*-sexing of domestic chicken via analysis of the allantoic fluid. In this respect sex identification takes place before the onset of embryonic pain perception. Aim of the present study was the evaluation of said technique on a larger scale in a commercial hatchery. To examine possible influences of the procedure on chicken health and production parameters, rearing and performance data of hatched female chicken were also analysed.

The trial was performed with fertile eggs from the layer strains Lohmann Brown (LB) and Lohmann Selected Leghorn (LSL). Allantoic fluid was withdrawn on day 8 + 4 h or 9 + 4 h of incubation and analysed via a competitive enzyme-linked immunosorbent assay measuring the oestrone sulphate concentration. Subsequently, the embryonic gender was assigned using a statistically established cut off value. Sexing accuracy averaged at 84% (day 8 + 4 h) and increased to 98% (LB) and 100% (LSL) for day 9 + 4 h old embryos. Compared to an untreated control group, the hatching rate of the experimental group was reduced by 1.4 to 3.5 points of percentage (LB) and 12.7 points of percentage (LSL) due to sampling of allantoic fluid. Hatching weight of the day-old chicks did not differ between both groups. Monitoring of the post hatching performance showed that sampling of the allantoic fluid has only negligible effects on the hens. Although weight distinctions between control and experimental group were observed during the rearing period, the adult hens' laying performance, egg weight and body live weight did not differ significantly between the groups.

These results demonstrate that the described method for *in ovo*-sexing is a potential and ethically justifiable alternative to the culling of day-old male layer chicks. The basic requirements for a practical implementation are fulfilled: The technique allows an accurate and reliable sexing and causes no reduction in the production performance of adult hens. The reduction of the hatching rate due to the sampling of allantoic fluid is an important factor for additional research. Further investigations are necessary to develop technical devices for a cost-effective implementation of this method in commercial hatcheries.

Key words

Chicken, *in ovo*-sexing, male day-old chicks, layers, rearing, laying performance

Zusammenfassung

In ovo-Geschlechtsbestimmung bei Legehybriden: Einfluss auf Schlupf und Produktionsleistung

Die aus ethischer Sicht bedenkliche Praxis der Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien erfordert die Entwicklung anwendbarer alternativer Möglichkeiten. In einer vorangegangenen Publikation ist von uns eine Methode zur *in ovo*-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn mittels endokriner Analyse der Allantoisflüssigkeit beschrieben worden. Der Zeitpunkt der Geschlechtsidentifikation liegt hierbei noch vor dem Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens. Ziel der vorliegenden Studie war es, die ursprünglich mit geringem Probenumfang etablierte Methode mit größeren Stückzahlen unter Praxisbedingungen in einer industriellen Brüterei zu überprüfen. Um einen möglichen Einfluss des *in ovo*-Sexens auf Schlupferfolg, Mortalität sowie Leistungsparameter der adulten Hennen auszuschließen, wurden zusätzlich Aufzucht- und Leistungsdaten der Hennen analysiert.

Für den Versuch wurden befruchtete Eier der Legelinien Lohmann Brown (LB) und Lohmann Selected Leghorn (LSL) verwendet. An Tag 8 + 4 h bzw. 9 + 4 h der Inkubation wurde Allantoisflüssigkeit aus den inkubierten Eiern entnommen und anschließend mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay die darin enthaltene Östronsulfatkonzentration bestimmt. Durch Anwendung eines statistisch errechneten Grenzwertes konnten die Eier nachfolgend einem Geschlecht zugeordnet werden. Die Prognosegenauigkeit betrug 84% bei Probenentnahme an Tag 8 + 4 h und stieg an Tag 9 + 4 h auf 98% (LB) bzw. 100% (LSL) an. Die Versuchsgruppe zeigte im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe eine um 1,4 bis 3,5 Prozentpunkte (LB) bzw. 12,7 Prozentpunkte (LSL) reduzierte Schlupfrate; das Schlupfgewicht der Küken unterschied sich nicht signifikant. Die Auswertung der Aufzucht- und Leistungsdaten der adulten Tiere. Während der Aufzuchtperiode konnten Gewichtsunterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe festgestellt werden. Während der Leistungsprüfung zeigten sich jedoch weder bei Legeleistung, Eigewicht noch Lebendgewicht signifikante Unterschiede.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die beschriebene Methode zum *in ovo*-Sexen eine mögliche und ethisch vertretbare Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken aus Legelinien darstellt. Die Grundvoraussetzungen für eine praktische Anwendung werden vollständig erfüllt: Die Methodik erlaubt eine genaue und verlässliche Geschlechtsbestimmung und beeinträchtigt nachfolgend auch die Leistung der Legehennen nicht. Um die aufgrund der Entnahme von Allantoisflüssigkeit reduzierte Schlupfrate zu verbessern, bedarf es weiterer Forschung. Ein zusätzlicher Schwerpunkt wird die Entwicklung einer Apparatur sein, welche eine kostengünstige Anwendung in Brütereien ermöglicht.

Stichworte

Huhn, *in ovo*-Geschlechtsbestimmung, männliche Eintagsküken, Legehennen, Aufzucht, Legeleistung

References

- ARNOLD, K.E., K.J. ORR, R. GRIFFITHS, 2003: Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. *Mol. Ecol.* **12**(12), 3451-3458.
- BIEDERMAN, I., M.M. SHIFFRAN, 1987: Sexing day-old chicks: A case study and expert systems analysis of a difficult perceptual-learning task. *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn.* **13**(4), 640-645.
- BODZSAR, N., H. EDING, T. REVAY, A. HIDAS, S. WEIGEND, 2009: Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Anim. Genet.* **40**(4), 516-523.
- BURKE, W.H., P.J. SHARP, 1989: Sex Differences in Body Weight of Chicken Embryos. *Poult. Sci.* **68**(6), 805-810.
- CLOSE, B., K. BANISTER, V. BAUMANS, E.M. BERNOTH, N. BROMAGE, J. BUNYAN, W. ERHARDT, P. FLECKNELL, N. GREGORY, H. HACKBARTH, D. MORTON, C. WARWICK, 1997: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission Lab. *Anim.* **31**(1), 1-32.
- DAKPOGAN, H.B., S. SALIFOU, A. ABOH, C. CHRYSOSTOME, 2012: Effectiveness of a sexing technique on day-old chick. *J. Anim. Plant. Sci.* **16**(2), 2336-2342.

- DAMME, K., M. RISTIC, 2003: Fattening performance, meat yield and economic aspects of meat and layer type hybrids. *World's Poult. Sci. J.* **59**(1), 50-53.
- DUTTON, C.J., A. TIEBER, 2001: A modified protocol for sex identification of in ovo avian embryos and its application as a management tool for endangered species conservation programs. *J. Anim. Sci.* **32**(2), 176-180.
- FREEMAN, B.M., M.A. VINCE, 1974: Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study. Chapman and Hall; Wiley, London, New York, ISBN 0412115204.
- GERKEN, M., D. JAENECKE, M. KREUZER, D.G. MARTIN, 2003: Growth, behaviour and carcass characteristics of egg-type cockerels compared to male broilers. *Worlds Poult. Sci. J.* **59**(1), 46-49.
- GRANEVITZE, Z., J. HILLEL, M. FELDMAN, A. SIX, H. EDING, S. WEIGEND, 2009: Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Anim. Genet.* **40**(5), 686-693.
- HAMILTON, H.L., 1952: Sensitive periods during development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **55**, 177-187.
- HELDMAIER, G., G. NEUWEILER, 2003: Vergleichende Tierphysiologie. Vegetative Physiologie. Springer, Berlin, ISBN 3540000674.
- ICKEN, W., M. SCHMUTZ, D. CAVERO, R. PREISINGER, 2013: Dual purpose chickens: The breeder's answer to the culling of day-old male layers. In: *World's Poultry Science Journal: 9th European Symposium on Poultry Welfare, Book of Abstracts*. 91.
- JENSEN, T., M. MACE, B. DURRANT, 2011: Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. *Zoo Biol.* **30**, 1-11.
- KOENIG, M., G. HAHN, K. DAMME, M. SCHMUTZ, 2012: Utilization of laying-type cockerels as "coquelets": Influence of genotype and diet characteristics on growth performance and carcass composition. *Arch. Geflügelk.* **76**(3), 197-202.
- LEESON, S., J.D. SUMMERS, 2009: Broiler breeder production. Nottingham University Press, Nottingham, ISBN 1904761798.
- PETITTE, J.N., A.E. KEGELMEYER, 1995: Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.* **6**(2), 119-130.
- PHELPS, P., A. BHUTADA, S. BRYAN, A. CHALKER, B. FERRELL, S. NEUMAN, C. RICKS, H. TRAN, T. BUTT, 2003: Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *Worlds Poult. Sci. J.* **59**(1), 33-38.
- RAUW, W.M., E. KANIS, E.N. NOORDHUIZEN-STASSEN, F.J. GROMMERS, 1998: Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* **56**(1), 15-33.
- ROITER, Y.S., A.V. EGOROVA, A.A. SEVAST'YANOVA, T.N. DEGTYAREVA, A.V. ALEKSANDROV, O.L. AMELINA, E.Y. BURMISTROVA, O.P. LESIK, 2011: Use of modifier genes in breeding color- and feather-sexed poultry. *Russ. Agricult. Sci.* **37**(5), 416-418.
- ROMANOFF, A.L., 1960: The avian embryo. Structural and functional development. Macmillan, New York.
- SEEMANN, G., 2003: Organisational framework for hatcheries. *Worlds Poult. Sci. J.* **59**(1), 59-61.
- SILVERUDD, M., 1978: Genetic Basis of Sexing Automation in the Fowl. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* **28**(2), 169-195.
- SONDER, M., 2012: Verwendung männlicher Hühnerküken aus Legehybridherkünften zur Erzeugung von Stubenküken. Doctoral Thesis. University of Hohenheim.
- STEINER, G., T. BARTELS, A. STELLING, M.-E. KRAUTWALD-JUNGHANNS, H. FUHRMANN, V. SABLINSKAS, E. KOCH, 2011: Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**(9), 2775-2782.
- TRAN, H.T., W. FERRELL, T.R. BUTT, 2010: An estrogen sensor for poultry sex sorting. *J. Anim. Sci.* **88**(4), 1358-1364.
- URICH, K., 1994: Comparative animal biochemistry. Springer-Verlag, Berlin, New York, ISBN 9783540574200.
- WEISSMANN, A., S. REITEMEIER, A. HAHN, J. GOTTSCHALK, A. EINSPANIER, 2013: Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology*. **80**, 199-205.

ERGEBNISSE

Europ.Poult.Sci., 78, 2014, ISSN 0003-9098, © Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. DOI: 10.1399/eps.2014.25

WOODS, J.E., D.M. BRAZZILL, 1981: Plasma 17-Beta-Estradiol Levels in the Chick-Embryo. Gen. Comp. Endocrinol. **44**(1), 37-43.

WOODS, J.E., R.M. SIMPSON, P.L. MOORE, 1975: Plasma testosterone levels in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. **27**(4), 543-547.

Correspondence: Prof. Dr. Almuth Einspanier, Institute of Physiological Chemistry, Veterinary Faculty, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; e-mail: Einspanier@vetmed.uni-leipzig.de.

4 DISKUSSION

Die Tötung männlicher Eintagsküken aus vorrangig wirtschaftlichen Gründen stellt in der heutigen Zeit ein ethisches und tierschutzrechtliches Problem dar (ELLENDORFF und KLEIN 2003). Betrachtet man insbesondere Ökonomie und Ökologie, existieren aktuell jedoch keine flächendeckend umsetzbaren Alternativen zu dieser Praxis. Möglichkeiten wie das Zweinutzungshuhn oder die Aufzucht männlicher Geschwisterküken sind aufgrund der im Vergleich zu spezialisierten Hybridlinien deutlich schlechteren Futterverwertung problematisch. Angesichts des stetig steigenden Nahrungsmittelbedarfs zur Versorgung der wachsenden Weltbevölkerung ist der erhöhte Futterverbrauch der Tiere als kritisch zu betrachten. Des Weiteren sind höhere Verkaufspreise und damit eine geringere Akzeptanz beim Verbraucher zu erwarten (KOERBER et al. 2009). Zusätzlich ist eine verlängerte Aufzucht auch mit einer gesteigerten Gülleproduktion und somit einer erheblichen Umweltbelastung verbunden (DAMME und RISTIC 2003, MOORE et al. 1995).

Die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung bietet die Möglichkeit, Eier mit männlichen Keimscheiben bzw. Embryonen vor dem Schlupf auszusortieren. Zum Schlupf gelangen somit idealerweise nur weibliche Tiere spezialisierter Legehybriden, die aufgezogen und für die Eierproduktion verwendet werden können. Die Geschlechtsbestimmung kann an zwei verschiedenen Zeitpunkten erfolgen. Eine Geschlechtsidentifikation vor Beginn der Bebrütung hat den Vorteil, dass nur die gewünschten weiblichen Eier in die Brutschränke verbracht und ein zusätzliches Handling während der Inkubation vermieden werden würde. Auch aus ethischer und tierschutzrechtlicher Sicht ist eine möglichst frühe Geschlechtsidentifizierung erwünscht. Probleme ergeben sich derzeit noch bei der praktischen Umsetzung bzw. der Anwendbarkeit. Eine Methode, welche die embryonale Vitalität nicht wesentlich beeinträchtigt und zusätzlich noch eine hohe Genauigkeit bei der Geschlechtsidentifikation aufweist, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung, Validierung und Evaluation einer Technik zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung während der Inkubation. Diese sollte aus Gründen des Tierschutzes vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens stattfinden. Der Beginn von bewusstem embryonalem Schmerzempfinden kann nicht exakt definiert werden (MELLOR und DIESCH 2007); daher wurde als Richtwert der Zeitpunkt gewählt, an dem das Nervensystem strukturell zur Schmerzempfindung in der Lage ist (Tag 10+12 h, CLOSE et al. 1997). Weitere Kriterien waren hohe Genauigkeit der Geschlechtszuordnung sowie geringer bzw. vernachlässigbarer Einfluss der Probenentnahme auf embryonale Vitalität, Schlupf und Leistung der adulten Tiere.

Die Ergebnisse wurden in Fachpublikationen veröffentlicht. Folgende Hauptresultate konnten durch die Untersuchungen erzielt werden:

1. Eine Geschlechtsidentifikation mittels Analyse der Allantoisflüssigkeit ist möglich; der hierfür geeignete endokrine Marker ist der Hormonmetabolit Östronsulfat (E₁S) (WEISSMANN et al. 2013).
2. Eine Geschlechtsidentifikation ist ab Tag 9 der Bebrütung und somit vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens möglich (WEISSMANN et al. 2013).
3. Die Entnahme von Allantoisflüssigkeit ab Tag 9 hat nur geringe negative Effekte auf embryonale Vitalität und Schlupferfolg (WEISSMANN et al. 2013, 2014a).
4. Die Auswirkungen auf Aufzucht- und Legeleistungsdaten der adulten Tiere sind vernachlässigbar (WEISSMANN et al. 2014a).

Nachfolgend sollen die vollständigen Ergebnisse ausführlich diskutiert werden.

Endokrine Marker zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung

Im Rahmen der ersten Teilstudie wurden die Konzentrationen der Sexualsteroid Testosteron und E₂ sowie des Metaboliten E₁S in der Allantoisflüssigkeit von n=750 Embryonen des Braunlegehybrides Lohmann Brown (LB, Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland) mittels eines kompetitiven ELISA von Tag 7 bis 10 der Inkubation untersucht. Ziel war es, potentielle Marker zur Geschlechtsbestimmung der Embryonen zu identifizieren (WEISSMANN et al. 2013).

Freies Testosteron konnte sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Embryonen an allen untersuchten Tagen in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung ergab an keinem der untersuchten Tage signifikante Differenzen zwischen den Geschlechtern. In einer Studie von EPPLÉ et al. (1997) wird in der Allantoisflüssigkeit von 13 und 14 Tage alten Embryonen mittels RIA kein freies Testosteron detektiert. Ein Vergleich des genannten RIA mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten ELISA bezüglich Sensitivität und Spezifität der Assaysysteme ist nicht möglich, da EPPLÉ et al. (1997) hierzu keine Angaben machen. Die Ergebnisse legen aber nahe, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete, speziell an das Haushuhn angepasste ELISA in Bezug auf die Analyse von Allantoisflüssigkeit genauere Resultate erzielt. Für die nicht signifikanten Differenzen zwischen männlichen und weiblichen Embryonen sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen wird ein Teil des Testosterons durch den Embryo zu Östrogenen aromatisiert (HAFFEN und CÈDARD

1968). Zum anderen kann Testosteron im sogenannten *allantoic waste* nachgewiesen werden. Dieses Sammelprodukt aus Allantois, extraembryonalen Membranen und Blutgefäßen sowie der Fäzes des Kükens verbleibt nach dem Schlupf in der Eischale (BENOWITZ-FREDERICKS et al. 2005). Es ist daher als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass Testosteron in der Allantoisflüssigkeit als konjugierter Hormonmetabolit vorliegt, welcher mit dem verwendeten ELISA nicht nachgewiesen werden kann. Diese Annahme wird durch die im Verlauf der Bebrütung nicht ansteigende Testosteronkonzentration in der Allantoisflüssigkeit unterstützt. Mit Einsetzen der endogenen Biosynthese von Sexualsteroiden steigen die Plasmakonzentrationen im Verlauf der Embryogenese von Tag 5 + 12 h bis 13 + 12 h stetig an (WOODS et al. 1975); dementsprechend wäre auch mit einer vermehrten Ausscheidung und somit ansteigenden Hormongehalten in der Allantois zu rechnen. Die tatsächlich ausgeschiedenen Testosteronmetabolite und deren potentiellen Geschlechtsdifferenzen erfordern weitergehende Untersuchungen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Assaysystem stellt Testosteron jedoch kein geeignetes Hormon zur Geschlechtsidentifikation von Hühnerembryonen dar.

E₂ konnte ab Tag 8 in der Allantoisflüssigkeit von Embryonen beiderlei Geschlechts detektiert werden. Immunfluoreszenzuntersuchungen embryonaler Gonaden zeigen, dass Östron (E₁) und E₂ ab Tag 3 + 12 h der Embryonalentwicklung sowohl in Ovarien als auch in Testes nachgewiesen werden können (WOODS und ERTON 1978). Zu der endogenen Synthese kommen maternale Sexualsteroiden, welche unabhängig vom embryonalen Geschlecht während der Eibildung in den lipophilen Dotter eingelagert werden. Durch Metabolisierung des Dotters während der Embryogenese werden die maternalen Steroide durch den Embryo resorbiert (PETRIE et al. 2001). Unabhängig von ihrer originären Herkunft werden die Hormone im Anschluss metabolisiert und über die Nieren ausgeschieden. Daher kann E₂ in der Allantoisflüssigkeit von männlichen und weiblichen Embryonen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikante Unterschiede in den E₂-Konzentrationen zwischen den Geschlechtern ab Tag 9 der Embryonalentwicklung gemessen werden. Dies lässt sich auf die endogene Biosynthese von E₂ in den Gonaden zurückführen, die bei weiblichen Embryonen ab Tag 6 + 12 h der Bebrütung signifikant höher ist (WOODS und ERTON 1978). Diese Differenzen sind ab Tag 7 + 12 h im Plasma (WOODS und BRAZZILL 1981) und – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte – mit weiterer Verzögerung an Tag 9 in der Allantoisflüssigkeit messbar. Vergleichende Studien zum Östrogengehalt in der Allantoisflüssigkeit zu diesem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung sind bislang noch nicht publiziert. EPPLÉ et al. (1997) analysieren die Zusammensetzung der Allantoisflüssigkeit von 13 und 14 Tage alten Embryonen mittels RIA. Hier kann nur konjugiertes E₂ nachgewiesen werden, freies Hormon ist nicht detektierbar. Genaue Angaben zu Sensitivität und Spezifität des Assaysystems fehlen in dieser Publikation.

Auch in einer früheren Veröffentlichung von GILL et al. (1983) können keine freien Östrogene in der Allantoisflüssigkeit von 8 bis 18 Tage alten Embryonen bestimmt werden. Dies bekräftigt die Annahme, dass ein auf die Analyse der Allantoisflüssigkeit des Haushuhnes angepasster ELISA sensitivere Analytik erlaubt als die in den zitierten Studien verwendeten RIA. Im Verlauf der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bebrütungstage war bei beiden Geschlechtern zuerst ein Anstieg in der E₂-Konzentration von Tag 8 zu Tag 9 und anschließend ein erneuter Abfall der Hormonkonzentration von Tag 9 zu Tag 10 zu erkennen. Im Vergleich dazu ist im Plasma ein stetiger Anstieg des E₂-Spiegels messbar (WOODS und BRAZZILL 1981). Eine mögliche Erklärung hierfür sind die lipophilen Eigenschaften des Steroids, die eine Passage biologischer Membranen ermöglichen. Dementsprechend akkumuliert das ausgeschiedene Hormon im Verlauf der Bebrütung nicht zwangsläufig in der hydrophilen Allantoisflüssigkeit, sondern kann z.B. über die CAM aus der Allantois heraus diffundieren. Eine weitere Möglichkeit wären sekundäre, im Anschluss an die Sezernierung stattfindende chemische Reaktionen des E₂ mit Bestandteilen der Allantoisflüssigkeit. Da der in der in dieser Arbeit verwendete ELISA nur ungebundenes E₂ nachweist, wären diese z.B. konjugierten oder proteingebundenen Hormone nicht detektierbar. Weiterführende Untersuchungen bezüglich des Verlaufes der Hormonkonzentrationen in der Allantoisflüssigkeit über den hier analysierten Bebrütungszeitraum hinaus wären sinnvoll, um die oben genannten Thesen zu verifizieren.

Der Hormonmetabolit E₁S konnte bei beiden Geschlechtern an den untersuchten Tagen 7 bis 10 der Bebrütung nachgewiesen werden. Während bei weiblichen Embryonen die Hormonkonzentrationen ab Tag 8 deutlich anstiegen, blieben diese bei den männlichen Embryonen auf einem konstant niedrigen Niveau. Signifikante Unterschiede waren ab dem 9. Tag der Embryonalentwicklung messbar. Die bei E₁S im Vergleich zu E₂ insgesamt höheren Konzentrationen stimmen mit der Studie von GILL et al. (1983) überein; in dieser Studie wird festgestellt, dass vorrangig konjugierte Steroide über die embryonalen Nieren ausgeschieden werden. Die Exkretion von hormonell inaktiven Metaboliten kann als Schutzmechanismus vor zu hohen Hormonkonzentrationen während der Embryogenese angesehen werden. Im Gegensatz zu freien Steroiden sind Steroidkonjugate wasserlöslich. Somit sind sie nach Exkretion durch die Nieren an die hydrophile Allantoisflüssigkeit gebunden und akkumulieren dort über den Verlauf der Embryonalentwicklung. GILL et al. (1983) können E₁S ab Tag 10 bei weiblichen Embryonen detektieren; die Konzentration des Metaboliten nimmt bis Tag 15 stetig zu. Für männliche Embryonen liegen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Die Sensitivität des verwendeten RIA wird mit 25,1 pg/ml angegeben. Auch wenn RIA und ELISA aufgrund der unterschiedlichen Detektionssysteme nicht direkt miteinander

verglichen werden können, sind die divergierenden Resultate angesichts der besseren Sensitivität des in der vorliegenden Arbeit genutzten ELISA (6 pg/ml) erklärbar.

Grenzwertbestimmung und Prognosegenauigkeit der Geschlechtsidentifikation

In dieser Arbeit konnten sowohl für E₂ als auch für E₁S ab Tag 9 der Embryonalentwicklung signifikante Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Embryonen festgestellt werden; die kumulative Verteilung zeigte ebenfalls ab Tag 9 für die beiden Steroide geschlechtsabhängig unterschiedliche Kurvenverläufe. Somit eignen sich potentiell sowohl E₂ als auch E₁S zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung (WEISSMANN et al. 2013).

Nichtsdestotrotz ergab die statistische Auswertung der Daten mittels Grenzwertoptimierungskurve an Tag 9 für E₁S eine im Vergleich zu E₂ deutlich größere Fläche unter der Kurve; somit ist die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Geschlechtsidentifikation bei E₁S höher. Dies bestätigte sich bei der Wahl eines geeigneten Grenzwertes zur Differenzierung von männlichen und weiblichen Embryonen. Bei E₂ konnte aufgrund der hohen Streuung der Hormonwerte kein Grenzwert die angestrebten Kriterien einer hohen Sensitivität und Spezifität erfüllen. Eine mittels E₂-Bestimmung ausreichend genaue Geschlechtsbestimmung war erst ab Tag 10 der Inkubation möglich. Rechnet man zusätzlich die benötigte Analysedauer von 1,5 Tagen mit ein, ist keine verlässliche Geschlechtsidentifikation vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens möglich. Daher erfüllt die Messung von E₂ die in dieser Arbeit angestrebten Kriterien für eine *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung nicht. Bei E₁S konnte an Tag 9 ein Grenzwert mit 86%iger Sensitivität und 83%iger Spezifität festgelegt werden. Dieser Wert wurde nachfolgend im Rahmen des zweiten Arbeitsabschnittes mit größeren Tierzahlen überprüft (WEISSMANN et al. 2014a). Aus produktionstechnischen Gründen der Brüterei befanden sich die Embryonen (n=2420, LB) bei Probenentnahme an Tag 8+4h der Bebrütung, d.h. die Allantois wurde im Verlauf des 9. Tages der Embryonalentwicklung entnommen. Eine korrekte Identifizierung des Geschlechts war in der Hauptstudie bei 83,5% der untersuchten Tiere möglich; die Genauigkeit des statistisch ermittelten Grenzwertes konnte somit bestätigt werden. Eine Fehlerquote von 16,5% ist jedoch für eine ökonomische flächendeckende Umsetzung in kommerziellen Brütereien zu hoch. Die derzeit gängigen Methoden, die zur Geschlechtsbestimmung bei Eintagsküken angewendet werden, erreichen in Abhängigkeit von Hühnerlinie, Methode und Erfahrung des Personals eine Genauigkeit von 95-99% (BIEDERMAN und SHIFFRAR 1987, DAKPOGAN et al. 2012, LEESON und SUMMERS 2009, ROITER et al. 2011, SILVERUDD 1978). Eine neue Methode zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung muss aus wirtschaftlichen Gründen ähnlich

präzise Aussagen erlauben. Um die Genauigkeit der Geschlechtsidentifizierung zu erhöhen, wurde im Folgenden der Zeitpunkt der Allantoisflüssigkeitsentnahme um 24 h nach hinten verlegt. Die Embryonen waren demnach bei Beprobung 9 + 4 h Tage alt. Mit dem für diesen Entwicklungszeitpunkt neu festgelegten Grenzwert (Sensitivität 98,2 %, Spezifität 96,6 %) konnte das Geschlecht von n = 2850 Embryonen der Herkunft LB mit 98,7 % richtig identifiziert werden. Da die Dauer der Hormonanalyse im Falle des E₁S nur ca. 4 h beträgt, ist ein Aussortieren männlicher Embryonen vor Erreichen des 10 + 12 h Entwicklungsstages und somit vor Eintritt des Schmerzempfindens möglich.

Der Grenzwert für Tag 9 + 4 h alte Embryonen wurde mittels Hormonanalyse von 500 Allantoisproben der Linie LB etabliert (WEISSMANN et al. 2014a). Letztendlich wird jedoch eine Methode zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung benötigt, die bei allen kommerziell verwendeten Legehybriden anwendbar ist. Beim Haushuhn ist jedoch eine deutliche genetische Diversität in Bezug auf Nutzungsrichtung (ZHANG et al. 2002) und Population vorhanden (BODZSAR et al. 2009). Auch innerhalb der Lege- und Mastlinien treten genetische Variationen auf (GRANEVITZE et al. 2009, VANHALA et al. 1998). Somit wären entsprechende Unterschiede bei der renalen Hormonexkretion in die Allantoisflüssigkeit möglich. Es konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass der Grenzwert von Braunlegehybriden der Herkunft LB auch auf Weißlegehybriden der Herkunft Lohmann Selected Leghorn (LSL; Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland) übertragen werden kann. Bei der Geschlechtsidentifikation von n = 150 Embryonen der Herkunft LSL wurde eine 100%ige Genauigkeit erreicht. Grund hierfür sind wahrscheinlich die aus evolutionärer Sicht hoch konservierten – und sich damit zwischen den Rassen und Linien nicht unterscheidenden – endokrinen Regulationsmechanismen, welche auch den Stoffwechsels der Östrogene mit einschließen (FREEMAN und VINCE 1974, HELDMAIER und NEUWEILER 2003, URICH 1994). Es ist daher davon auszugehen, dass die beschriebene Methode mit dem etablierten Grenzwert auch auf andere Linien bzw. Herkünfte anwendbar ist. Zur abschließenden Klärung dieser Hypothese sind jedoch weiterführende Untersuchungen unerlässlich.

Auswirkungen der Probenentnahme auf Embryonalentwicklung und Schlupf der Küken

Die Embryonalentwicklung von Hühnern ist sehr anfällig für externe Störungen. Abweichungen von der physiologischen Bruttemperatur, Luftfeuchtigkeit oder aber mechanische Störungen führen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium zu einer unterschiedlich starken Beeinträchtigung der Embryogenese bis hin zu embryonaler Mortalität (DECUYPERE und BRUGGEMAN 2007, HAMILTON 1952, NEW 1957, RIDDLE

1930). Es ist anzunehmen, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte, für die Probensammlung notwendige Perforation der Eischale und die anschließende Entnahme von Allantoisflüssigkeit einen zusätzlichen Störfaktor für die Embryonalentwicklung darstellt. Eine mögliche Folge kann z.B. eine allgemein reduzierte embryonale Vitalität sein, welche sich letztendlich in einer verringerten Schlupfrate oder einem reduziertem Schlupfgewicht der Küken zeigt.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Probenentnahme an den Tagen 7 bis 10 der Bebrütung durchgeführt (WEISSMANN et al. 2013). Generell war die embryonale Sterblichkeit bei einer Punktion an den Tagen 7 und 8 höher als an den Tagen 9 und 10. Die Auswertung ergab eine vermehrte Mortalität sowohl zum Zeitpunkt der Beprobung als auch um Tag 19 der Bebrütung, d.h. zu Beginn des Schlupfprozesses. Die Tage 7 und 8 der Embryonalentwicklung fallen mit einer besonders sensiblen Phase der Embryogenese zusammen. In diesem Zeitpunkt finden umfangreiche physiologische Veränderungen statt und der Embryo weist eine erhöhte Anfälligkeit für externe Störungen auf (MORAN 2007). Die mit der Beprobung verbundene Entnahme aus dem Brutschrank und die nachfolgende Punktion (Zeitdauer insgesamt ca. 15 min.) kann wahrscheinlich in diesem Stadium schlechter vom Embryo verkraftet werden als an den Tagen 9 und 10. Auch die höhere Mortalität um den 19. Tag der Bebrütung ist möglicherweise eine Spätfolge der Probenentnahme. Da jedoch zu diesem Zeitpunkt auch bei ungestörtem Brutverlauf eine vermehrte embryonale Sterblichkeit auftritt (RIDDLE 1930), muss die Punktion der Allantois nicht zwangsläufig auch die Ursache sein.

Die Allantoisflüssigkeit wurde in zwei verschiedenen Eipositionen (horizontal, 45°-Winkel) entnommen (WEISSMANN et al. 2013). In Bezug auf die Verlässlichkeit der Probenentnahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Lagerungstechniken. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Lagerung des Eies im 45°-Winkel die embryonale Mortalität deutlich verringert. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe kam es bei der Versuchsgruppe zu einer nur unwesentlichen Reduktion der Schlupfrate. Gründe hierfür sind wahrscheinlich die physikalischen Eigenschaften des Eiinhaltes sowie die Eiform. Dotter und Embryo besitzen ein höheres spezifisches Gewicht als die Allantois. Daher sammelt sich letztgenannte nach kurzer Ruhephase immer am höchsten Punkt des Eies, direkt unter der Eischale (PHELPS et al. 2003, RICKS et al. 2003). In horizontaler Lagerung ist die Allantois in ihrer seitlichen Ausdehnung nicht eingeschränkt und erstreckt sich somit flächig über die gesamte Länge des Eies. Bei einer 45°-Lagerung hingegen bildet die Luftkammer zur einen Seite eine natürliche Begrenzung. Bei gleichem Flüssigkeitsgehalt dehnt sich die Allantois somit mehr in die Tiefe aus als in der horizontalen Lagerung. Dadurch liegt der Embryo, welcher unterhalb

der Allantois auf dem Dotter schwimmt, bei dieser Lagerung weniger nah an der Eischale. Die Gefahr einer unbeabsichtigten Verletzung des Embryos bei Punktion der Allantois ist somit reduziert.

Für die Versuche des zweiten Arbeitsabschnittes wurde daher die 45°-Lagerung der Eier ausgewählt. Während sich die Schlupfraten im ersten Abschnitt bei dieser Lagerung im Vergleich zur Kontrollgruppe nur um ca. einen Prozentpunkt reduzierten, wurde bei den direkt in der Brüterei durchgeführten Versuchen eine Reduktion um 1,4-3,5 (LB) bzw. 12,7 (LSL) Prozentpunkte beobachtet (WEISSMANN et al. 2014a). Die deutlich größere Anzahl an untersuchten Eiern ($n=5420$ vs. $n=750$) sowie die manuelle Beprobung sind höchstwahrscheinlich Ursache für die schlechteren Schlupfraten. Dieser menschliche Fehler könnte durch ein noch zu entwickelndes Gerät zur automatisierten Allantoisentnahme eliminiert werden. Die Schlupfraten sollten in diesem Fall auch bei der Beprobung großer Eiermengen nicht oder nur geringgradig reduziert sein. Aus logistischen Gründen befanden sich die Eier außerdem über einen vergleichsweise längeren Zeitraum außerhalb des Inkubators, wodurch der Stress auf die Embryonen zusätzlich erhöht war. Bei einer Automatisierung wäre demnach entweder ein Aufrechterhalten der Bruttemperatur während der Beprobung oder eine zügige Probenentnahme wünschenswert.

Für die Untersuchung der Hormonwerte wurden ca. 25-100 µl Allantoisflüssigkeit je Ei entnommen. Da der Embryo bis zum Ende der Entwicklung die Allantoisflüssigkeit fast vollständig resorbiert und diese für einen ausgeglichenen Wasserhaushalt und somit erfolgreichen Schlupf vonnöten ist (FREEMAN und VINCE 1974), könnte die Verringerung des Volumens einen Einfluss auf die embryonale Vitalität haben. Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurde jedoch bei den beprobten Eiern kein statistischer Zusammenhang zwischen entnommenem Probenvolumen und Schlupferfolg festgestellt. Es ist daher davon auszugehen, dass das entnommene Volumen in Relation zum Gesamtvolumen (maximal 7 ml an Tag 13 der Bebrütung; ROMANOFF 1960) für den Embryo nicht relevant ist.

Das Schlupfgewicht der Küken wurde im zweiten Arbeitsabschnitt dokumentiert und ausgewertet (WEISSMANN et al. 2014a). Zwischen Versuchs- und Kontrolltieren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei den Küken der Herkunft LB waren männliche Eintagsküken tendenziell etwas schwerer als die weiblichen Geschwistertiere. Für Hühner wird dieses Phänomen erstmals von BURKE und SHARP (1989) beschrieben. Männliche Embryonen haben demnach bereits ab Tag 11 der Bebrütung signifikant höhere Körpergewichte als weibliche. Somit sind die beobachteten Differenzen beim Schlupf mit sehr großer Wahrscheinlichkeit durch einen

natürlicherweise auftretenden Geschlechtsdimorphismus und nicht durch die Allantoisentnahme bedingt.

Auswirkungen der Probenentnahme auf Aufzucht und Leistungsparameter der Hennen

Um mögliche Spätfolgen der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung bei den untersuchten Tieren ausschließen zu können, wurden die Aufzucht- und Leistungsdaten von LB-Hennen der Versuchsgruppe mit LB-Hennen der Kontrollgruppe verglichen (WEISSMANN et al. 2014a).

Während der 17-wöchigen Aufzuchtperiode wiesen die Tiere beider Gruppen (Versuch: n=150, Kontrolle: n=80) gute Gewichtszunahmen sowie geringe Mortalitätsraten auf. Trotzdem konnten in Woche 4 und 6 signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren hinsichtlich des Körpergewichtes festgestellt werden. Fünf Tiere aus der Versuchsgruppe waren bezüglich ihrer Gewichtsentwicklung deutlich zurückgeblieben (Körpermasse <400g). Dies spiegelte sich auch in der Uniformität wider, einem Merkmal für die Homogenität einer Gruppe gemäß ihrem Körpergewicht. Hierbei sind Werte >85 % als „sehr gut“, zwischen 80-85 % als „gut“, von 70-80 % als „mittelmäßig“ und <70 % als „schlecht“ zu beurteilen (LOHMANN TIERZUCHT GMBH 2012). In den Wochen 2 und 4 befanden sich beide Gruppen im „mittelmäßigen“ bis „guten“ Bereich. In Woche 6 hingegen sank die Uniformität in der Versuchsgruppe auf einen mit 66 % „schlechten“ Wert ab, wohingegen sich die Kontrollgruppe weiterhin im „guten“ Bereich befand. Es ist zu vermuten, dass es sich bei den Gewichtsdivergenzen um Zufallsbefunde aufgrund der geringen Gruppengröße handelt. Jedoch ist zu bedenken, dass auch die Allantoisentnahme eine mögliche Ursache für die höhere Anzahl an Kümmerern in der Versuchsgruppe sein kann. Weitere Aufzuchtversuche mit größeren Gruppengrößen sind zur Beantwortung dieser Fragestellung erforderlich.

Für die Überprüfung der Leistungsdaten wurden n=120 Tiere der Versuchsgruppe und n=60 Tiere der Kontrollgruppe nach der Aufzuchtperiode in Bodenhaltung bis zu einem Alter von 33 Wochen eingestallt. Die Leistungsdaten (Legeleistung, Futterverbrauch pro Tier, mittleres Eigewicht, Körpergewicht der Hennen) unterschieden sich nur geringgradig zwischen den beiden Gruppen. In Bezug auf Eigewicht, Körpergewicht sowie Futterverbrauch konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Nur die mittlere Legeleistung, berechnet von Beginn der maximalen Produktion (>92 % Legeleistung in der gesamten Gruppe) bis Lebenswoche 32, unterschied sich um einen Prozentpunkt. Höchstwahrscheinlich ist dieses Resultat aber der im Vergleich zur Versuchsgruppe niedrigeren Tieranzahl in der Kontrollgruppe geschuldet und stellt

somit einen Zufallsbefund dar. Die erhobenen Leistungsdaten beider Gruppen decken sich mit den für die Herkunft LB angegebenen Richtwerten (LOHMANN TIERZUCHT GMBH 2013a). Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung mittels Analyse der Allantoisflüssigkeit bis Lebenswoche 33 keine nachweisbaren negativen Effekte auf die Leistungs- und Gesundheitsparameter der adulten Hennen hat. Auch in den sich diesem Untersuchungszeitraum anschließenden Leistungskontrollen konnten bis einschließlich Lebenswoche 41 keine Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren in Bezug auf Futterverbrauch, Legeleistung, Eigewicht und Bruchfestigkeit der Eischale festgestellt werden (WEISSMANN et al. 2014b). Es ist anzunehmen, dass sich auch im weiteren Verlauf der Produktionsperiode keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben werden. Zur genauen Abklärung sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Praktische Umsetzung der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung

Ein wichtiges Kriterium für die Realisierung einer *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung in kommerziellen Brütereien ist die Kosteneffizienz der angewandten Methode. Es ist davon auszugehen, dass eine flächendeckende Umsetzung nur dann stattfinden wird, wenn sich die neue Technik in einem ähnlichen Preisrahmen wie das derzeit übliche Sexen von Eintagsküken bewegt. Eine interne Kostenkalkulation für die hier beschriebene Hormonanalyse ergab einen Preis von 12 Cent pro Ei. Hierbei wurden nur die reinen Sachkosten des Assaysystems basierend auf der Untersuchung von 1000 Proben berechnet. Dies erscheint auf den ersten Blick teurer als das Sexen nach dem Schlupf, welches je nach angewandeter Methode 1,5 bis 4,5 Cent kostet (persönliche Mitteilung, DR. ANKE FÖRSTER, Cuxhaven, 23.08.2013). Letztendlich können jedoch bei einer *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung außer den finanziellen Aufwendungen für das Sexen auch die Kosten für die Bebrütung reduziert werden. Bei einer Geschlechtsidentifikation an Tag 18 verringern sich diese um 14% (SEEMANN 2003). Durch das Vorverlagern des Zeitpunktes der Elimination männlicher Embryonen auf Tag 9 ergäben sich weitere Einsparmöglichkeiten. Des Weiteren ist anzunehmen, dass sich die Kosten der Hormonanalyse noch weiter reduzieren, wenn sämtliche Verbrauchsmaterialien in großen Mengen bezogen werden. Weiterführende Untersuchungen sollten daher zum Ziel haben, eine *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung zu entwickeln, welche keine Mehrkosten für die Brütereien verursacht.

Im Hinblick auf den ethischen Anspruch muss trotz des frühen Entwicklungsstadiums an Tag 9+4h ein tierschutzkonformes Töten der männlichen Embryonen direkt im Anschluss an die Geschlechtsidentifikation gewährleistet sein. Eine gesetzliche Regelung

hierzu gibt es derzeit noch nicht. Die für Wirbeltiere geltende TierSchlV schreibt zwar für nicht schlupffähige Küken eine sofortige Tötung vor; Embryonen gehören aber laut Definition nicht in den Geltungsbereich dieser Verordnung (ANON. 2012). Bei Umsetzung einer flächendeckenden *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung wären daher zusätzliche gesetzliche Neuregelungen notwendig. In Anlehnung an die bereits existierenden Vorschriften wäre eine Homogenisierung des gesamten Eies ein denkbares, praktisch gut umsetzbares Verfahren, welches den sofortigen Tod der Embryonen gewährleisten kann.

Eine sinnvolle Nutzung der abgetöteten männlichen Embryonen ist aus ethischer und ökonomischer Sicht wünschenswert. Auch für diesen Aspekt gibt es zurzeit noch keine genauen gesetzlichen Rahmenbedingungen. Futtermittelrechtliche Regelungen existieren für tierische Nebenprodukte, welche als „Tierkörper, Tierkörperteile oder Erzeugnisse tierischen Ursprungs, die nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, einschließlich Eizellen, Embryonen und Samen“ definiert sind. Tierische Nebenprodukte der Kategorie 3, zu denen u. a. auch Schalen, Brüterenebenprodukte und Knickeiprodukte von klinisch gesunden Tieren gehören, können z.B. für die Heimtierfutterproduktion verwendet werden (ANON. 2002). Diese Verwertung wäre auch für die männlichen Embryonen mitsamt dem restlichen Eiinhalt (inklusive Eischale) denkbar. Im Falle einer Homogenisierung des gesamten Eies muss allerdings der aufgrund der Kalkschale hohe Mineralstoffgehalt beachtet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verwendung des hochwertigen Proteinanteils der aussortierten Eier besteht in der Verarbeitung zu Futtermitteln für Tiere in Aquakulturen. Diese dürfen nach EU-Recht mit verarbeitetem Nichtwiederkäuer-Protein gefüttert werden (ANON. 2013).

Vergleich mit anderen Methoden zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung

Es gibt derzeit zahlreiche Forschungsansätze zur Geschlechtsbestimmung von Hühnerembryonen; basierend auf unterschiedlichen Techniken soll das Sexen auf einen möglichst frühen Zeitpunkt der Bebrütung vorgezogen werden. Der überwiegende Anteil der publizierten Verfahren befindet sich noch in einem frühen Stadium der Entwicklung, sodass eine Gesamteinschätzung in Bezug auf Genauigkeit, Praktikabilität und Einfluss auf den Embryo nur begrenzt möglich ist. Grundsätzlich wäre eine Geschlechtsbestimmung an Tag 0 aufgrund von Tierschutz und Ethik, aber auch aus Praktikabilitätsgründen einer Geschlechtsbestimmung während der Inkubation vorzuziehen. Da sich jedoch die Probenentnahme zu diesem Zeitpunkt besonders negativ auf die Embryonalentwicklung auszuwirken scheint (KLEIN und ELLENDORFF 1998), ist eine praktische Umsetzung von Verfahren am nicht bebrüteten Ei derzeit

beinahe unmöglich. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine korrekt durchgeführte Geschlechtsbestimmung am bebrüteten Ei den Embryo nur unwesentlich beeinträchtigt (WEISSMANN et al. 2013, 2014a).

Die Geschlechtsbestimmung erfolgt je nach Methodik an embryonalem Zellmaterial, Blut oder Allantoisflüssigkeit. Allgemein kann festgestellt werden, dass die auf der Entnahme von Blut basierenden Verfahren (DUTTON und TIEBER 2001, JENSEN et al. 2011) aufgrund der individuellen Ausprägung extraembryonaler Blutgefäße für eine standardisierte Beprobung weniger geeignet sind. Auch die Entnahme von Zellmaterial aus der Keimscheibe scheint mit den derzeit beschriebenen Methoden (KLEIN und ELLENDORFF 1998) einen zu stark negativen Einfluss auf die Embryogenese zu haben, um als Grundlage einer praxistauglichen Alternative zu dienen. Die Allantoisflüssigkeit hingegen kann standardisiert entnommen werden; außerdem wird die embryonale Vitalität durch die Prozedur nur geringgradig reduziert (PHELPS et al. 2003, WEISSMANN et al. 2013, 2014a). Somit ist sie als Medium zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung zu favorisieren.

In Bezug auf die angewandten Detektionssysteme gibt es deutliche methodische Unterschiede. Für die Anwendbarkeit bei großen Stückzahlen in kommerziellen Brütereien ist eine schnelle Geschlechtsdiagnostik unabdingbar. Die auf molekularbiologischen Nachweisen basierenden Verfahren (PCR, FISH) sind somit aufgrund des Zeitfaktors weniger geeignet. Die beschriebenen optischen Methoden (OCT, FTIR, Durchflusszytometrie) erlauben zwar eine zeitnahe Analytik, kommen derzeit aber aufgrund der notwendigen Blastodermzellentnahme für eine flächendeckende *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung nicht in Frage. Im Gegensatz dazu erlaubt die von PHELPS et al. (2003) und TRAN et al. (2010) beschriebene Analyse der Allantoisflüssigkeit auf Östrogene mittels eines Biotransformationsassays eine sehr genaue, schnelle und kostengünstige Geschlechtsbestimmung. Auch die Schlupfrate ist nur minimal reduziert. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch der Zeitpunkt der Geschlechtsbestimmung (Tag 17). In diesem Entwicklungsstadium ist die Embryogenese schon fast vollständig abgeschlossen, dementsprechend ist ein embryonales Schmerzempfinden vorhanden. Obwohl eine Umsetzung dieser Technik der Tötung männlicher Eintagsküken vorzuziehen wäre, kann sie daher aus tierschutzrechtlicher und ethischer Sicht nicht als zufriedenstellend eingestuft werden. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Technik der *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung beruht ebenfalls auf der Untersuchung von Allantoisflüssigkeit, jedoch basiert die Analytik auf einem E₁S-ELISA (WEISSMANN et al. 2013). Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie eine Identifikation des embryonalen Geschlechts bei 9+4h Tage alten Embryonen, also zu Beginn des 10. Bebrütungstages, erlaubt. Inklusive der benötigten Analysedauer von ca.

4 h kann somit das Geschlecht vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens (Tag 10 + 12 h) mit 98%iger Wahrscheinlichkeit richtig identifiziert werden (WEISSMANN et al. 2014b).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit eine verlässliche und praktikable Methode zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung etabliert werden konnte. Die hier beschriebene Technik entspricht einem Großteil der von KALETA und REDMANN (2008) geforderten Kriterien einer idealen Methodik: Sie hat einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf die Embryonalentwicklung sowie die Schlupfrate. Gleichzeitig führt sie zu keiner Beeinträchtigung der Leistung und Vitalität der adulten weiblichen Tiere. Des Weiteren ist eine Geschlechtsdiagnostik innerhalb kurzer Zeit durchführbar und kostet nur wenige Cent pro untersuchtes Ei. Damit sind die Grundvoraussetzungen für eine flächendeckende Umsetzung in kommerziellen Brütereien erfüllt. Aufgrund einer Geschlechtsidentifikation vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens kann auch dem Anspruch einer ethischen und tierschutzkonformen Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken genüge getan werden. In weiterführenden Untersuchungen muss nun an der Entwicklung einer praxistauglichen und kostengünstigen Vorrichtung zur Probenentnahme und -analyse sowie an einer weiteren Verkürzung der Analysedauer gearbeitet werden. Zusätzliche, noch zu klärende Aspekte sind die tierschutzkonforme Tötung der Embryonen sowie die nachfolgende mögliche Nutzung der aussortierten Eier.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Anne Weißmann

In-ovo-Geschlechtsbestimmung bei Legehybriden mittels endokriner Analyse der Allantoisflüssigkeit

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig

Eingereicht im Februar 2014

61 Seiten, 2 Publikationen, 1 Abbildung, 0 Tabellen, 156 Literaturangaben, 2 Anhänge

Schlüsselwörter: Geschlechtsbestimmung, *in ovo*, Legehybriden, Steroide, Allantoisflüssigkeit

In Deutschland werden jährlich über 40 Millionen männliche Eintagsküken aus Legelinien aufgrund vorrangig wirtschaftlicher Interessen getötet. Dies stellt sowohl ein ethisches als auch ein tierschutzrechtliches Problem dar (ANON. 2006, IDEL 2007). Gerade vor dem Hintergrund aktueller politischer Entscheidungen (MUNLV NRW 2013, NI MELV 2014) besteht ein Bedarf an Alternativen zur Tötung männlicher Eintagsküken. Verschiedene Lösungsansätze wie z.B. das Zweinutzungshuhn (ICKEN et al. 2013) oder aber die Mast männlicher Geschwisterhühner (KAUFMANN und ANDERSSON 2013) sind derzeit aus ökonomischen und ökologischen Gründen nicht flächendeckend realisierbar. Eine weitere Möglichkeit bietet die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung. Hierbei wird das embryonale Geschlecht bereits vor dem Schlupf identifiziert; nachfolgend können die Eier mit männlichen Embryonen aussortiert werden. Um sowohl ethischen als auch tierschutzrechtlichen Aspekten Genüge zu tun, sollte die Geschlechtsidentifikation dabei vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens stattfinden (Tag 10+12 h der Bebrütung; CLOSE et al. 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer verlässlichen Methode zur *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung anhand geschlechtsspezifischer Differenzen im Hormongehalt der Allantoisflüssigkeit sieben bis zehn Tage alter Hühnerembryonen. Nachfolgend wurde der Einfluss der Geschlechtsbestimmung auf die embryonale Entwicklung, Schlupferfolg, Aufzucht sowie die Leistungsparameter der adulten Tiere analysiert.

Im Rahmen der ersten Teilstudie erfolgte die Beprobung von n=750 Eiern des Braunlegehybrids Lohmann Brown (LB, Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland). Der minimalinvasiven Entnahme von Allantoisflüssigkeit folgte die Untersuchung auf 17β-

Östradiol (E₂), Östronsulfat (E₁S) und Testosteron mittels an das Haushuhn angepassten Enzymimmunoassays (ELISA). Es konnten sowohl für E₂ als auch für E₁S signifikante ($p < 0,01$) geschlechtsspezifische Differenzen in der Allantoisflüssigkeit von neun und zehn Tage alten Embryonen nachgewiesen werden. Die Testosteronkonzentration hingegen zeigte an keinem der untersuchten Tage geschlechtsabhängige Unterschiede und erwies sich somit für die *In-ovo*-Geschlechtsbestimmung als ungeeignet. Die statistische Auswertung ergab, dass die Bestimmung von E₁S eine frühere und genauere Geschlechtsidentifikation ermöglicht als die von E₂. Der für E₁S festgelegte Grenzwert erreicht bei neun Tage alten Embryonen eine 86%ige Sensitivität und 83%ige Spezifität.

In der zweiten Teilstudie wurde die zuvor etablierte Technik der Geschlechtsbestimmung mittels E₁S an 8 + 4 h ($n = 2420$) und 9 + 4 h ($n = 2850$) Tage alten Embryonen der Herkunft LB sowie an $n = 150$ 9 + 4 h alten Embryonen des Weißlegehybrids Lohmann Selected Leghorn (LSL, Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland) überprüft. Das Geschlecht der 8 + 4 h Tage alten Embryonen konnte zu 84 % korrekt identifiziert werden. Dieser Wert stieg bei 9 + 4 h Tage alten Embryonen auf 98 % (LB) bzw. 100 % (LSL) an. Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe ($n = 5258$) wurde die Schlupfrate durch die Entnahme von Allantoisflüssigkeit um 1,4-3,5 (LB) bzw. 12,7 Prozentpunkte (LSL) reduziert. Nachfolgend wurden 150 Tiere der Versuchsgruppe und 80 Tiere der Kontrollgruppe für eine Aufzuchtperiode von 17 Wochen eingestallt. Hierbei zeigten sich hinsichtlich des Körpergewichtes signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in Woche 4 und 6, wobei die Zunahmen in der Versuchsgruppe geringer waren. Anschließend wurde die Leistung von 120 Tieren der Versuchsgruppe und 60 Tieren der Kontrollgruppe bis Lebenswoche 33 bezüglich Legeleistung, Eigewicht, Körpergewicht sowie Futterverbrauch analysiert. Bei keinem der untersuchten Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p > 0,05$).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine verlässliche Geschlechtsbestimmung *in ovo* bei 9 + 4 h Tage alten Hühnerembryonen mithilfe einer Bestimmung der E₁S-Konzentration in der Allantoisflüssigkeit möglich ist; zudem ist die beschriebene Methode bei verschiedenen Legelinien anwendbar. Die Entnahme von Allantoisflüssigkeit führt zwar zu einer minimalen Reduktion der Schlupfrate, bei adulten Legehennen kommt es jedoch zu keiner Beeinträchtigung der Produktionsleistung. Demnach erfüllt das etablierte Verfahren alle Grundvoraussetzungen für eine Anwendung in kommerziellen Brütereien. Da die Geschlechtsbestimmung vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens erfolgt, kann sie somit als Grundlage für eine ethisch vertretbare Alternative zum Töten männlicher Eintagsküken angesehen werden.

6 SUMMARY

Anne Weißmann

In ovo sexing of laying hen hybrids using endocrine analysis of the allantoic fluid

Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in February 2014

61 pages, 2 publications, 1 figure, 0 tables, 156 references, 2 appendices

Keywords: Sexing, *in ovo*, laying hen hybrids, steroids, allantoic fluid

In Germany about 40 million day-old male chicks are culled each year predominantly because of economic reasons. From the animal welfare as well as the ethical point of view this is a problematic situation (ANON. 2006, IDEL 2007). Particularly with regard to current political decisions (MUNVL NRW, NI MELV 2014) alternatives to the culling of male day-old chicks are required. Different approaches such as a dual-purpose breed (ICKEN et al. 2013) or the fattening of male layer-hybrids (KAUFMANN and ANDERSSON 2013) are not ubiquitous marketable at present due to economic and ecological reasons. *In ovo* sexing represents another option; the embryonic gender is determined before hatch and the eggs containing male embryos can be eliminated subsequently. To comply with ethical and animal welfare aspects, the sexing should take place before the onset of embryonic pain perception (embryonic day 10 + 12 h; CLOSE et al. 1997).

Aim of this thesis was the development of a reliable method for *in ovo* gender identification with the help of sex-specific differences in the hormone concentration of the allantoic fluid of seven to ten day old chick embryos. Subsequently, the influence of gender identification on embryonic development, hatching rate, rearing as well as production performance of the adult hens was analysed.

Within the first study n=750 eggs of the brown layer-hybrid Lohmann Brown (LB; Lohmann Tierzucht GmbH, Germany) were sampled for allantoic fluid. After the minimally invasive withdrawal the allantoic fluid was analysed via enzyme immunoassays (ELISA) adapted to domestic chicken for 17 β -oestradiol (E₂), oestrone sulphate (E₁S) and testosterone. With regard to E₂ and E₁S, significant (P<0.01) sex-specific differences were observed in the allantoic fluid of nine and ten day old embryos. Testosterone on the other hand displayed no gender-related variances on any of the analysed days. Therefore, it proved to be unsuitable for gender identification using the

SUMMARY

method applied in this study. Statistical analysis showed that the analysis of E₁S allows an earlier and more accurate sexing than the E₂-assay. The limit value determined for E₁S has a sensitivity of 86 % and a specificity of 83 % for nine day old embryos.

The previously established method for gender identification via E₁S detection in the allantoic fluid was verified with a larger number of samples in the second study. The allantoic fluid of day 8+4 h (n=2420) and day 9+4 h (n=2850) old LB embryos as well as n=150 day 9+4 h old embryos of the white layer-hybrid Lohmann Selected Leghorn (LSL; Lohmann Tierzucht GmbH, Germany) was analysed. For day 8+4 h old embryos the sex was correctly identified in 84 %. The accuracy of gender prediction increased for day 9+4 h old embryos up to 98 % (LB) and 100 % (LSL). Compared to an untreated control group (n=5258) sampling of allantoic fluid reduced the hatching rate by 1.4-3.5 (LB) and 12.7 points of percentage (LSL). In the following, 150 animals of the experimental group and 80 animals of the control group were reared for a period of 17 weeks. With regard to the body weight significant differences ($P < 0.05$) were observed in weeks 4 and 6, with the animals of the experimental group having a lower body weight. Subsequently the production performance of 120 hens from the experimental and 60 hens from the control group was analysed up to an age of 33 weeks. With respect to egg production, egg weight, body weight and feed consumption no significant differences ($P > 0.05$) were observed between the groups.

The results of this thesis demonstrate that a reliable *in ovo* sexing of day 9+4 h old chicken embryos is possible via the measurement of E₁S in the allantoic fluid; additionally the method is not limited to a certain layer strain. The sampling of allantoic fluid reduces the hatching rate only marginally. The production performance of adult hens on the other hand is not affected. Therefore, the described technique fulfils all the basic requirements for an alternative method to the culling of day-old male layer chicks. Because gender identification takes place before the onset of embryonic pain perception it can serve as the basis for an ethical alternative to the culling of male day-old chicks from layer-hybrids.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alonso-Alvarez C. Manipulation of primary sex-ratio: an updated review. *Avian Poult Biol Rev.* 2006;17(1):1–20.

Anon. Durchführungsverordnung (EG) Nr. 889/2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen hinsichtlich der ökologischen/biologischen Produktion, Kennzeichnung und Kontrolle vom 5. Sept. 2008a. *AblEG.* Nr. L 250/1 (18. Sept. 2008).

Anon. Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 18. Mai 2006. *BGBL.* Nr. 25:1206 (31. Mai 2006).

Anon. Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte vom 3. Okt. 2002. *AblEG.* Nr. L 273/1 (10. Okt. 2002).

Anon. Verordnung (EG) Nr. 543/2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 hinsichtlich der Vermarktungsnormen für Geflügelfleisch vom 16. Juni 2008b. *AblEG.* Nr. L 157/46 (17. Juni 2008).

Anon. Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung vom 24. Sept. 2009. *AblEG.* Nr. L 303/1 (18. Nov. 2009).

Anon. Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (TierSchlV) vom 20. Dez. 2012. *BGBL.* Nr. 63:2982 (31. Dez. 2012).

Anon. Verordnung (EU) Nr. 56/2013 der Kommission zur Änderung der Anhänge I und IV der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien vom 16. Januar 2013. *AblEU.* Nr. L 21/3 (24. Jan. 2013).

Arnold KE, Orr KJ, Griffiths R. Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. *Mol Ecol.* 2003;12(12):3451–8.

Arthur JA, O'Sullivan N. Breeding chickens to meet egg quality needs. *International Hatchery Practice.* 2005;19:7–9.

Bartels T, Fischer B, Kruger P, Koch E, Ryll M, Krautwald-Junghanns ME. 3D-X-ray microcomputer tomography and optical coherence tomography as methods for the localization of the blastoderm in the newly laid unincubated chicken egg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2008;115(5):182–8.

Bellairs R, Osmond M. The atlas of chick development. San Diego: Academic Press; 1998.

Benowitz-Fredericks ZM, Kitaysky AS, Wingfield JC. Steroids in Allantoic Waste: An Integrated Measure of Steroid Exposure in ovo. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1046(1):204–13.

Biederman I, Shiffrar MM. Sexing day-old chicks: A case study and expert systems analysis of a difficult perceptual-learning task. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn.* 1987;13(4):640–5.

- Bodzsar N, Eding H, Revay T, Hidas A, Weigend S. Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Anim Genet.* 2009;40(4):516–23.
- Bokkers E, Koene P. Eating behaviour, and preprandial and postprandial correlations in male broiler and layer chickens. *Br Poult Sci.* 2003;44(4):538–44.
- Bruggeman V, van As P, Decuypere E. Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002;131(4):839–46.
- Brunstrom B, Axelsson J, Mattsson A, Halldin K. Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;163(1-2):97–103.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 2012. Tabelle 499. Eierzeugung und Legeleistung (zitiert vom 19. Aug. 2013), <<http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-8033100-0000.pdf>>.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 2013a. Kennzahlen des deutschen Eiermarktes Stand: 25. März 2013 (zitiert vom 19. Aug. 2013), <<http://www.bmelv-statistik.de/de/fachstatistiken/andere-fachstatistiken/>>.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 2013b. Statistischer Monatsbericht Bereich A Landwirtschaft: Viehhaltung und Veterinärwesen: Tabelle 0117660. Brütereien, eingelegte Bruteier und geschlüpfte Küken (zitiert vom 19. Aug. 2013), <<http://www.bmelv-statistik.de/de/statistischer-monatsbericht/a-landwirtschaft/>>.
- Burke WH, Sharp PJ. Sex Differences in Body Weight of Chicken Embryos. *Poult Sci.* 1989;68(6):805–10.
- Burkhardt A, Meister S, Bergmann R, Koch E. Influence of storage on the position of the germinal disc in the fertilized unincubated chicken egg. *Poult Sci.* 2011;90(10):2169–73.
- Butt T, Tran HT. Compositions and methods for gender sorting. United States Patent Nr. 7,083,941 B2 vom 1. Aug. 2006.
- Caspar J. Der vernünftige Grund im Tierschutzgesetz. *NuR.* 1997;12:577–83.
- Chue J, Smith CA. Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS Journal.* 2011;278(7):1027–34.
- Clark H, Fischer D. A reconsideration of nitrogen excretion by the chick embryo. *J Exp Zool.* 1957;136(1):1–15.
- Clinton M, Haines L, Belloir B, McBride D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br Poult Sci.* 2001;42(1):134–8.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim.* 1997;31(1):1–32.
- Cunningham FJ, Wilson SC, Knight PG, Gladwell RT. Chicken ovulation cycle. *J Exp Zool.* 1984;232(3):485–94.

- Dakpogan HB, Salifou S, Aboh A, Chrysostome C. Effectiveness of a sexing technique on day-old chick. *J Anim Plant Sci.* 2012;16(2):2336–42.
- Damme K, Hildebrand R. Geflügelhaltung: Legehennen, Puten- und Hähnchenmast. Stuttgart: Ulmer; 2002.
- Damme K, Ristic M. Fattening performance, meat yield and economic aspects of meat and layer type hybrids. *Worlds Poult Sci J.* 2003;59(1):50–3.
- De Oliveira JE, Uni Z, Ferket PR. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *Worlds Poult Sci J.* 2008;64(04):488.
- Decuypere E, Bruggeman V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. *Poult Sci.* 2007;86(5):1037–42.
- Dorshorst BJ, Ashwell CM. Genetic mapping of the sex-linked barring gene in the chicken. *Poult Sci.* 2009;88(9):1811–7.
- Dutton CJ, Tieber A. A modified protocol for sex identification of in ovo avian embryos and its application as a management tool for endangered species conservation programs. *J Anim Sci.* 2001;32(2):176–80.
- Elbrecht A, Smith R. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science.* 1992;255(5043):467–70.
- Ellegren H. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol Evol.* 2000;15(5):188–92.
- Ellendorff F, Klein S. Current knowledge on sex determination and sex diagnosis: potential solutions. *Worlds Poult Sci J.* 2003;59(1):7.
- Engelhardt N, Henriksen R, Groothuis TGG. Steroids in chicken egg yolk: metabolism and uptake during early embryonic development. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;163(1-2):175–83.
- Epple A, Gower B, Busch M ten, Gill T, Milakofsky L, Piechotta R et al. Stress responses in avian embryos. *Am Zool.* 1997;37(6):536–45.
- Fasenko GM. Egg storage and the embryo. *Poult Sci.* 2007;86(5):1020–4.
- Flock DK, Laughlin KF, Bentley J. Minimizing losses in poultry breeding and production: how breeding companies contribute to poultry welfare. *Worlds Poult Sci J.* 2005;61(2):227–37.
- Freeman BM, Vince MA. Development of the avian embryo: A behavioural and physiological study. London, New York: Chapman and Hall; Wiley; 1974.
- Fridolfsson A, Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol.* 1999;30(1):116–21.
- Garner DL. Sex-Sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl.* 2001;22(4):519–26.
- Gawron MF, Smyth JR. The Use of Blue-Splashed White Down in Color Sexing Crosses. *Poult Sci.* 1980;59(11):2369–72.
- Gerken M, Jaenecke D, Kreuzer M, Martin DG. Growth, behaviour and carcass characteristics of egg-type cockerels compared to male broilers. *Worlds Poult Sci J.* 2003;59(1):46–9.

- Gill DV, Robertson HA, Betz TW. In vivo estrogen synthesis by the developing chicken (*Gallus gallus*) embryo. *Gen Comp Endocrinol*. 1983;49(2):176–86.
- Goddard C, Wilkie RS, Dunn IC. The relationship between insulin-like growth factor-1, growth hormone, thyroid hormones and insulin in chickens selected for growth. *Domest Anim Endocrinol*. 1988;5(2):165–76.
- Granevitze Z, Hillel J, Feldman M, Six A, Eding H, Weigend S. Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Anim Genet*. 2009;40(5):686–93.
- Griffin HD, Goddard C. Rapidly growing broiler (meat-type) chickens. Their origin and use for comparative studies of the regulation of growth. *Int J Biochem*. 1994;26(1):19–28.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol*. 1998;7(8):1071–5.
- Haffen K, Cédard L. Etude, en culture organotypique in vitro, du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de poulet. *Gen Comp Endocrinol*. 1968;11(1):220–34.
- Hahn A, Reitemeier S, Gottschalk J, Haense M, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K, Krautwald-Junghanns ME, Einspanier A. Assessment of the male reproductive status in Psittaciformes by endocrine analysis. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2011;39(4):249–257.
- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951;88(1):49–92.
- Hamilton HL. Sensitive periods during development. *Ann N Y Acad Sci*. 1952;55:177–87.
- Heldmaier G, Neuweiler G. *Vergleichende Tierphysiologie: 2, Vegetative Physiologie*. 2. Aufl. Berlin: Springer; 2004.
- Hirt A, Maisack C, Moritz J. *Tierschutzgesetz: Kommentar*. München: Vahlen; 2003.
- Hocking PM, Hughes BO, Keer-Keer S. Comparison of food intake, rate of consumption, pecking activity and behaviour in layer and broiler breeder males. *Br Poult Sci*. 1997;38(3):237–40.
- Huang ES, Kao KJ, Nalbandov AV. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol Reprod*. 1979;20(3):454–61.
- Hummel G. *Anatomie und Physiologie der Vögel: Kompendium für Studium und Praxis*. Stuttgart: Ulmer; 2000.
- Hutchison N. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. *J Cell Biol*. 1987;105(4):1493–500.
- Hy-Line International. Hy-Line Brown Performance Summary. 2012a (zitiert vom 6. Sept. 2013), <http://www.hyline.com/UserDocs/products/BRN_PERF_ENG.pdf>.
- Hy-Line International. Hy-Line W-36 Performance Summary. 2012b (zitiert vom 6. Sept. 2013), <http://www.hyline.com/UserDocs/products/36_PERF_ENG.pdf>
- Icken W, Schmutz M, Caverio D, Preisinger R. Dual purpose chickens: The breeder's answer to the culling of day-old male layers. *Proceedings of the 9th European Symposium on Poultry Welfare*; 2013 June 17–20; Uppsala, Sweden. *Worlds Poult Sci J*; 2013.

Idel A. Zweinutzung ist ein Muss. *Ökol Landbau*. 2007;142(2):30–1.

Imholt D. Morphometrische Studien an Eiern von Hybrid- und Rassehühnern mit Versuchen zur Detektion einer Beziehung zwischen der Form von Eiern und dem Geschlecht der darin befindlichen Küken: Eine oologische und mathematische Studie [Dissertation med. vet.]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2010.

International Association for the Study of Pain (IASP). IASP Taxonomy: Pain Terms. 2013 (zitiert vom 28. Dez. 2013), <http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions>.

ISA - A Hendrix Genetics Company. ISA Product Performance - ISA Brown Commercial Layer. 2011a (zitiert vom 6. Sept. 2013), <<http://www.isapoultry.com/products/isa/~media/Files/ISA/ISA%20product%20information/ISA/Commercials/201112%20ISA%20Brown%20FP%20product%20performance.pdf>>.

ISA - A Hendrix Genetics Company. ISA Product Performance - ISA White Commercial Layer. 2011b (zitiert vom 6. Sept. 2013), <<http://www.isapoultry.com/products/isa/isa-white/~media/Files/ISA/ISA%20product%20information/ISA/Commercials/201112%20ISA%20White%20product%20performance.ashx>>.

Jacob J, Pescatore T, Cantor A. Sexing day-old chicks. University of Kentucky, College of Agriculture. 2011 (zitiert vom 05.01.2014), <<https://www.yumpu.com/en/document/view/11282043/sexing-day-old-chicks-in-the-college-of-agriculture-university-of->>.

Jensen T, Mace M, Durrant B. Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. *Zoo Biol*. 2011;30:1–11.

Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:93–107.

Kaleta E, Redmann T. Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *Worlds Poult Sci J*. 2008;64(03):391–99.

Katz IA, Millar RP, King JA. Differential regional distribution and release of two forms of gonadotropin-releasing hormone in the chicken brain. *Peptides*. 1990;11(3):443–50.

Kaufmann F, Andersson R. Eignung männlicher Legehybriden zur Mast. 2013 (zitiert vom 30. Aug. 2013), <<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:959-opus-121>>.

Klein S, Baulein U, Rokitta M, Marx G, Thielebein J, Ellendorff F. Sexing the freshly laid egg – development of embryos after manipulation; analytical approach and localization of the blastoderm in the intact egg. *Worlds Poult Sci J*. 2003;59(1):39–44.

Klein S, Ellendorff F. Analysis of chicken embryonic development after removal of blastodermal cells for sexing. *Br Poult Sci*. 1998;39(4):482–7.

Klein S, Ellendorff F. Localisation of Xho1 repetitive sequences on autosomes in addition to the W chromosome in chickens and its relevance for sex diagnosis. *Anim Genet*. 2000;31(2):104–9.

Klein S, Rokitta M, Baulain U, Thielebein J, Haase A, Ellendorff F. Localization of the fertilized germinal disc in the chicken egg before incubation. *Poult Sci*. 2002;81(4):529–36.

- Koenig M, Hahn G, Damme K, Schmutz M. Utilization of laying-type cockerels as "coquelets": Influence of genotype and diet characteristics on growth performance and carcass composition. Arch Geflügelk. 2012;76(3):197–202.
- Koerber K von, Kretschmer J, Prinz S, Dasch E. Globale Nahrungssicherung für eine wachsende Weltbevölkerung–Flächenbedarf und Klimarelevanz sich wandelnder Ernährungsgewohnheiten. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 2009;4(2):174–89.
- Landestierschutzbeauftragte Hessen (LBT) 2014. Millionenfache Tötung männlicher Eintagsküken (zitiert vom 13. Jan 2014), <http://www.tierschutz.hessen.de/irj/Tierschutz_Internet?cid=7785238c544ff290727dadd39909dd0b>.
- Leenstra FR, van Horne P, van Krimpen M. Rapport 263: Verkenning van de marktkansen voor een combi-kip in Nederland – Investigation of market perspectives for a dual purpose chicken in The Netherlands. Livestock Research Wageningen UR; 2009.
- Leeson S, Summers JD. Broiler breeder production. Nottingham: Nottingham University Press; 2009.
- Lichovníková M, Jandásek J, Jůzl M, Dračková E. The meat quality of layer males from free range in comparison with fast growing chickens. Czech J Anim Sci. 2009;54(11):490–7.
- Liebich H. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2010.
- Lipar JL, Ketterson ED, Nolan V, JR., Casto JM. Egg Yolk Layers Vary in the Concentration of Steroid Hormones in Two Avian Species. Gen Comp Endocrinol. 1999;115(2):220–7.
- Lohmann Tierzucht GmbH. LOHMANN BROWN-CLASSIC: Leistungsdaten. 2013a (zitiert vom 6. Sept. 2013), <<http://www.ltz.de/produkte/Legehennen/LOHMANN-BROWN-CLASSIC/>>.
- Lohmann Tierzucht GmbH. LOHMANN LSL-CLASSIC: Leistungsdaten. 2013b (zitiert vom 6. Sept. 2013), <<http://www.ltz.de/produkte/Legehennen/LOHMANN-LSL-CLASSIC/>>.
- Lohmann Tierzucht GmbH. Management Guide Alternative Haltung. Cuxhaven: Lohmann Tierzucht GmbH; 2012.
- Lunn J. Chick sexing. Am Sci. 1948;36(2):280–7.
- Masic B, Wood-Gush DGM, Duncan IJH, McCorquodale C, Savory CJ. A comparison of the feeding behaviour of young broiler and layer males. Br Poult Sci. 1974;15(5):499–505.
- Masui K, Hashimoto J. Sexing Baby Chicks. Vancouver: Journal Printing Company, Ltd; 1933.
- Mellor DJ, Diesch TJ. Onset of sentience: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. Appl Anim Behav Sci. 2006;100(1–2):48–57.
- Mellor DJ, Diesch TJ. Birth and hatching: key events in the onset of awareness in the lamb and chick. N Z Vet J. 2007;55(2):51–60.

- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MUNLV NRW) 2013. Minister Remmel: "Tiere sind keine Abfallprodukte" NRW stärkt den Tierschutz: Töten männlicher Küken nach Übergangszeit ab 2015 verboten/ Ordnungsverfügungen an 12 Brütereien in NRW verschickt – Pressemitteilung des MUNVL NRW vom 23.12.2013 (zitiert vom 28.12.2013), <https://www.umwelt.nrw.de/ministerium/presse/presse_aktuell/presse131223.php>.
- Moore PA, Daniel TC, Sharpley AN, Wood CW. Poultry manure management: Environmentally sound options. *J Soil Water Conserv.* 1995;50(3):321–7.
- Moran ET. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult Sci.* 2007;86(5):1043–9.
- Müller G. Rentabilitätsfragen in der Hühnerhaltung. Frankfurt: DLG Verlags GmbH; 1962.
- Munro CJ, Stabenfeldt GH, Cragun JR, Addiego LA, Overstreet JW, Lasley BL. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clin Chem.* 1991;37(6):838-844.
- Murawska D, Bochno R. Comparison of the Slaughter Quality of Layer-Type Cockerels and Broiler Chickens. *J Poult Sci.* 2007;44(1):105–10.
- Nanda I, Zend-Ajus E, Shan Z, Grutzner F, Scharthl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M. Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;89(1-2):67–78.
- Navara KJ. The Role of Steroid Hormones in the Adjustment of Primary Sex Ratio in Birds: Compiling the Pieces of the Puzzle. *Integr Comp Biol.* 2013;53(6):923-37.
- New DA. A critical period for the turning of hens' eggs. *J Embryol Exp Morphol.* 1957;5(3):293–9.
- Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (NI MELV), 2011. Neuer Tierschutzplan für Niedersachsen – Pressemitteilung des NI MELV vom 14.02.2011 (zitiert vom 04.01.2014), <http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=1810&article_id=94218&psmand=7>.
- Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (NI MELV), 2014. Tierschutzplan Niedersachsen, Fachinformationen Legehennen (zitiert vom 04.01.2014), <http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=32023&article_id=110604&psmand=7>.
- Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K. Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol Reprod Dev.* 2000;55(1):20–30.
- Nomura O, Nakabayashi O, Nishimori K, Yasue H, Mizuno S. Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;71(3-4):103–9.
- Ort J. Zur Tötung unerwünschter neonater und juveniler Tiere. *NuR.* 2010;32(12):853–61.

- Petitte JN, Kegelmeyer AE. Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim Biotechnol.* 1995;6(2):119–30.
- Petrie M, Schwabl H, Brande-Lavridsen N, Burke T. Maternal investment: Sex differences in avian yolk hormone levels. *Nature* 2001;412(6846):498–9.
- Phelps P, Bhutada A, Bryan S, Chalker A, Ferrell B, Neuman S, Ricks C, Tran H, Butt T. Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *Worlds Poult Sci J.* 2003;59(1):33–8.
- Porat N, Bogdanov K, Danielli A, Arie A, Samina I, Hadani A. Direct detection of chicken genomic DNA for gender determination by thymine-DNA glycosylase. *Br Poult Sci.* 2011;52(1):58–65.
- Rahil KS, Narbaitz R. Differentiation of male chick oviducts under hormonal stimulation. *Gen Comp Endocrinol.* 1972;18(2):315–8.
- Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest Prod Sci.* 1998;56(1):15–33.
- Remignon H, Gardahaut MF, Marche G, Ricard FH. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. *J Muscle Res Cell Motil.* 1995;16(2):95–102.
- Ricks CA, Mendu N, Phelps PV. The embryonated egg: a practical target for genetic based advances to improve poultry production. *Poult Sci.* 2003;82(6):931–8.
- Riddle O. Studies on the physiology of reproduction in birds. XXVII. The age distribution of mortality in bird embryos and its probable significance. *Amer Journ Physiol.* 1930;94:535–47.
- Roiter YS, Egorova AV, Sevast'yanova AA, Degtyareva TN, Aleksandrov AV, Amelina OL, Burmistrova EY, Lesik OP. Use of modifier genes in breeding color- and feather-sexed poultry. *Russ Agricult Sci.* 2011;37(5):416–18.
- Romanoff AL. The avian embryo. Structural and functional development. New York: Macmillan; 1960.
- Rosenbruch M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX.* 1997;14(3):111–3.
- Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* 2. Aufl. Berlin: Parey; 1998.
- Salomon F. *Lehrbuch der Geflügelanatomie.* Jena, Stuttgart: G. Fischer; 1993.
- Schaeublin H. Mastversuch mit Junghähnen und Bio-Futter: Was leisten Junghähne von Legelinien? *Schweiz Geflügelzeitung.* 2005;10:13–4.
- Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere.* 6. Aufl. Stuttgart: Enke; 2011. p. 121.
- Scholtyssek S. *Geflügel.* Stuttgart: Ulmer; 1987.
- Schuurs AHW, van Weemen BK. Enzyme-Immunoassay: A powerful analytical tool. *J Immunoassay.* 1980;1(2):229–49.
- Seemann G. Organisational framework for hatcheries. *Worlds Poult Sci J.* 2003;59(1):59–61.

- Shan Z, Nanda I, Wang Y, Schmid M, Vortkamp A, Haaf T. Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;89(3-4):252–7.
- Siegmann O, Neumann U, Behr KP. *Kompendium der Geflügelkrankheiten*. 6. Aufl. Hannover: Schlütersche; 2005.
- Silverudd M. Genetic Basis of Sexing Automation in the Fowl. *Acta Agric Scand A Anim Sci*. 1978;28(2):169–95.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*. 2009;461(7261):267–71.
- Smith CA, Sinclair AH. Sex determination in the chicken embryo. *J Exp Zool*. 2001;290(7):691–9.
- Smith CA, Sinclair AH. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*. 2004;26(2):120–32.
- Sonder M. Verwendung männlicher Hühnerküken aus Legehybridherkünften zur Erzeugung von Stubenküken. [Dissertation agr.] Hohenheim: Universität Hohenheim; 2012.
- St John J, Quinn TW. Chromosome-Specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *Auk*. 1998;115(4):1074–8.
- Steiner G, Bartels T, Stelling A, Krautwald-Junghanns M, Fuhrmann H, Sablinskas V, Koch E. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400(9):2775–82.
- Tanabe Y, Nakamura T, Fujioka K, Doi O. Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*. 1986;63(3):456–63.
- Tiersch TR. Identification of sex in chicken by flow cytometry. *Worlds Poult Sci J*. 2003;59(1):25–32.
- Tran HT, Ferrell W, Butt TR. An estrogen sensor for poultry sex sorting. *J Anim Sci*. 2010;88(4):1358–64.
- Urich K. *Comparative animal biochemistry*. Berlin, New York: Springer; 1994.
- Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, Vilkkilä J, Mäki-Tanila A. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poult Sci*. 1998;77(6):783–90.
- Volkery J, Gottschalk J, Sobiraj A, Wittek T, Einspanier A. Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis. *Vet Rec*. 2012;171(8):195. DOI: 10.1136/vr.100393.
- Weissmann A, Förster A, Gottschalk J, Reitemeier S, Krautwald-Junghanns ME, Preisinger R, Einspanier A. *In ovo*-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance. *Eur Poult Sci*. 2014a;78: DOI 10.1399/eps.2014.25.

- Weissmann A, Förster A, Gottschalk J, Reitemeier S, Preisinger R, Einspanier A. *In ovo* Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei mittels Hormonuntersuchung: Eine Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken. Tagungsband zur 19. Internationalen Fachtagung zum Thema Tierschutz „Theorie und Praxis zum Vollzug des Tierschutzgesetzes“; 20.-21. Febr. 2014; München, Deutschland. Gießen: Verlag der DVG Service GmbH; 2014b. ISBN 978-3-86345-198-1.
- Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology*. 2013;80:199–205.
- Whittow GC. *Sturkie's avian physiology*. 5. Aufl. San Diego: Academic Press; 2000.
- Woods JE, Brazzill DM. Plasma 17-Beta-Estradiol Levels in the Chick-Embryo. *Gen Comp Endocrinol*. 1981;44(1):37–43.
- Woods JE, Erton LH. The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol*. 1978;36(3):360–70.
- Woods JE, Simpson RM, Moore PL. Plasma testosterone levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol*. 1975;27(4):543–7.
- Wu JJ, Li WM, Feng YP, Zhao RX, Wang C, Yu Y et al. Sex-biased mortality analysis in chick embryos during the entire period of incubation. *J Appl Poult Res*. 2012;21(3):508–12.
- Zhang X, Leung FC, Chan DK, Yang G, Wu C. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds based on protein polymorphism, randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism. *Poult Sci*. 2002;81(10):1463–72.
- Zimmermann M. Physiologische Mechanismen von Schmerz und Schmerztherapie. *Prakt Tierarzt*. 1983;64(1):10–25.

8 ANHANG

8.1 Weitere Publikationen

Abstracts zu Kongressbeiträgen (Poster/Vorträge)

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Tätzner S, Gottschalk J, Einspanier A. In-ovo sex determination in the domestic chicken (*Gallus gallus f. dom.*) via endocrine analysis. Tagungsband zur 45. Jahrestagung der Fachgruppe Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung; 29. Feb.-2. März 2012; Berlin, Deutschland. Reprod Dom Anim. 2012; 47 (Suppl. 2):153. (Poster)

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Tätzner S, Gottschalk J, Einspanier A. Neue Methoden zur frühzeitigen Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus gallus f. dom.*). Tagungsband zur 37. Leipziger Fortbildungsveranstaltung: Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung; 22. Juni 2012; Leipzig, Deutschland. (Vortrag)

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. *In ovo* sexing of domestic chicken using endocrine analysis. Proceedings of the IX European Symposium on Poultry Welfare; 2013 June 17-20; Uppsala, Sweden. (Poster)

Weissmann A, Förster A, Gottschalk J, Reitemeier S, Preisinger R, Einspanier A. *In ovo* Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei mittels Hormonuntersuchung: Eine Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken. Tagungsband zur 19. Internationalen DVG Fachtagung zum Thema Tierschutz „Theorie und Praxis zum Vollzug des Tierschutzgesetzes“; 20.-21. Febr. 2014; München, Deutschland. Gießen: Verlag der DVG Service GmbH; 2014. ISBN 978-3-86345-198-1. (Vortrag)

Originalarbeiten

Krautwald-Junghanns ME, Bartels T, Burkhardt A, Cramer K, Einspanier A, Fischer B, Förster A, Koch E, Popp J, Preisinger R, Steiner G, Sydow R, Weber K, **Weissmann A**. Geschlechtsdifferenzierung im Ei. DGS Magazin 2012; 35:25-29.

8.2 Manuskript zu einem Vortrag auf der 19. Internationalen DVG Fachtagung zum Thema Tierschutz „Theorie und Praxis zum Vollzug des Tierschutzgesetzes“ am 20.-21. Februar 2014 in München

Anne Weissmann, Anke Förster, Jutta Gottschalk, Susanne Reitemeier, Rudolf Preisinger, Almuth Einspanier

***In ovo* Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei mittels Hormonuntersuchung: Eine Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken**

Verlag der DVG Service GmbH; 2014. ISBN 978-3-86345-198-1.

¹Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Leipzig

²Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven

IN OVO GESCHLECHTSBESTIMMUNG IM BEBRÜTETEN HÜHNEREI MITTELS HORMONUNTERSUCHUNG: EINE ALTERNATIVE ZUR TÖTUNG MÄNNLICHER EINTAGSKÜKEN

A. Weissmann¹, A. Förster², J. Gottschalk¹, S. Reitemeier¹, R. Preisinger², A. Einspanier¹

Die hohe negative Korrelation zwischen Fleischansatz und Reproduktion hat in der Geflügelzucht - wie auch bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren - die Haltung von spezialisierten Linien begünstigt [1]. Während bei Masthühnern beide Geschlechter aufgezogen und gemästet werden können, ist bei Legehennen die konventionelle Aufzucht männlicher Tiere aufgrund von geringen Tageszunahmen und schlechter Futterverwertung nicht wirtschaftlich. Daher werden in Deutschland jährlich ca. 40 Millionen männliche Eintagsküken getötet [2, 3]. Obwohl diese teilweise zur Fütterung anderer Tiere verwendet werden (z.B. in Zoos), ist die Situation aus ethischer Sicht bedenklich [4].

Verschiedene Lösungsvarianten zur Vermeidung der Tötung wurden bis jetzt untersucht. Ein Ansatz ist dabei die wirtschaftliche Nutzung männlicher Geschwisterküken. Dies ist zum Einen über die Zucht einer Zweinutzungsrasse möglich, bei der weibliche Tiere für die Eierproduktion und männliche für die Mast genutzt werden. Die bereits erwähnte negative Korrelation zwischen Wachstums- und Reproduktionseigenschaften führt allerdings dazu, dass weder die Lege- noch die Mastleistung an die von spezialisierten Hybridlinien heranreicht. Eine Nutzung dieser Rassen würde also zwangsläufig zu höheren Verbraucherpreisen führen [6]. Eine weitere Möglichkeit ist die Aufzucht männlicher Legehybriden. Unter extensiven Haltungsbedingungen verringern sich in Bezug auf Wachstum und Futterverwertung die Differenzen zwischen Mast- und Legelinien [7]. Auch eine Vermarktung der Tiere als sogenannte Stubenküken wird diskutiert [8]. Es ist jedoch unbestritten, dass die männlichen Geschwister der Legehennen trotz alledem in der Mastleistung den Broilerlinien unterlegen sind. Daher wurde bisher aus ökonomischen und ökologischen Gründen keine dieser Alternativen flächendeckend realisiert.

Einen zweiten Ansatz bietet die *in ovo*-Geschlechtsbestimmung. Hierbei wird das Geschlecht der Embryonen vor dem Schlupf bestimmt. Eier mit männlichen Embryonen können anschließend aussortiert werden und kommen somit nicht zum Schlupf. Die Geschlechtsbestimmung kann entweder vor (Embryonaltag E0) oder während der Bebrütung (E1-20) stattfinden. Für sämtliche derzeit bekannten Methoden muss eine Perforation der Eischale erfolgen. Techniken zur Geschlechtsidentifikation an E0 bedienen sich der genetischen Differenzen der Keimscheibe. Bei Vögeln ist das weibliche Geschlecht heterogametisch (Geschlechtschromosomen ZW) und das männliche homogametisch (ZZ) [9]. Da das Z- im Vergleich zum W-Chromosom einen um ca. 2% höheren DNA-Gehalt aufweist [10], kann anhand dieses Unterschiedes das Geschlecht mittels optischer Methoden bestimmt werden [11, 12]. Auch geschlechtsspezifische Gensequenzen auf dem Z-Chromosom können mittels molekularbiologischer Methoden detektiert und zum *in ovo*-Sexen verwendet werden [13, 14]. Für diese Verfahren müssen Blastodermzellen aus der Keimscheibe entnommen und analysiert werden; belastbare Studien zum Einfluss dieses Verfahrens auf die Embryovitalität gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Auch praxisreife Geschlechtsbestimmungsverfahren zum Einsatz in industriellen Brütereien sind derzeit nicht existent.

Ansätze zur Geschlechtsidentifikation während der Bebrütung bedienen sich der DNA-Analyse embryonalen Zellmaterials [15, 16] oder der Detektion hormoneller Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Embryonen [17, 18]. Für die DNA-Analyse werden Zellen aus dem embryonalen Blut benötigt. Da die Lokalisation der extraembryonalen Blutgefäße individuell unterschiedlich ist, kann keine standardisierte Entnahme erfolgen und erschwert somit die Etablierung eines Routineverfahrens in Betrieben. Differenzen in den Konzentrationen von Sexualsteroiden (Östrogene, Testosteron) können im Blut ab E7,5 gemessen werden [19, 20]. Nach Verstoffwechselung in der Leber werden die wasserlöslichen Metaboliten über die Nieren in die Allantois, ein extraembryonales Exkretionsreservoir, ausgeschieden [21]. Diese kann aufgrund ihrer Lokalisation im Ei standardisiert punktiert werden [17]; die entnommene Allantoisflüssigkeit wird im Anschluss auf geschlechtsspezifische Hormone untersucht.

Im Hinblick auf ethische und tierschutzrechtliche Aspekte ist beim *in ovo*-Sexen während der Bebrütung der Zeitpunkt der Geschlechtsidentifikation und somit der Tötung männlicher Embryonen entscheidend. Das embryonale Nervensystem ist ab E10,5 so weit differenziert, dass ein Schmerzempfinden möglich ist [22]. Auch wenn Studien den Beginn von Empfindungsvermögen und Bewusstsein des Embryos zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ansiedeln [23, 24], ist eine Geschlechtsbestimmung vor E10,5 anzustreben. Dieses Kriterium wird von keiner derzeit bekannten Technik erfüllt.

Ziel dieser Studie war es, eine verlässliche und praktikable Methode zur *in ovo*-Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Hühnerei vor E10,5 mittels Hormonanalyse in einem Enzymimmunoassay (ELISA) der Allantoisflüssigkeit zu entwickeln. Im Anschluss sollten möglichen Auswirkungen auf Schlupf, Aufzucht sowie Leistungsparameter der adulten Tiere evaluiert werden.

In einer ersten Teilstudie [25] wurden zwei verschiedene Techniken zur Allantoisentnahme in Bezug auf den Einfluss auf die Vitalität des Embryos untersucht. Des Weiteren wurden potentielle Hormonmarker (Testosteron, 17- β Östradiol, Östronsulfat) zur Geschlechtsbestimmung identifiziert. Die Untersuchungen wurden zwischen E7 und E10 an 750 bebrüteten Eiern der Legelinie Lohmann Brown (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) durchgeführt. Im ELISA konnten signifikante Differenzen zwischen männlichen und weiblichen Embryonen an E9 und E10 für 17- β Östradiol und Östronsulfat (E_1S) gemessen werden; die Testosteronwerte unterschieden sich an keinem der untersuchten Tage zwischen den Geschlechtern. Die weitere statistische Auswertung mit Grenzwertberechnung zeigte, dass zur Geschlechtsidentifikation E_1S als Marker aufgrund einer höheren Prognosegenauigkeit zu favorisieren ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Punktion der Allantois in 45° Lagerung des Eies die Schlupfrate nur um ca. 1 Prozentpunkt reduziert wird.

In einer zweiten Teilstudie [26] wurde die genannte Methode mit einer größeren Stückzahl in einer industriellen Brüterei überprüft. Die Geschlechtsidentifizierung erfolgte durch Bestimmung der Östronsulfatkonzentration in der Allantoisflüssigkeit von 5270 Eiern der Legehennenlinie Lohmann Brown (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven). An E8+4h (n=2420) und E9+4h (n=2850) der Bebrütung wurde Allantoisflüssigkeit (25-100 μ l) minimalinvasiv aus den Eiern entnommen. Die Geschlechtszuordnung erfolgte anhand eines vorher etablierten Grenzwertes. Es ergab sich eine Prognosegenauigkeit von 83,5% (E8+4h) bzw. 98,7% (E9+4h). Durch die Allantoisentnahme reduzierte sich die Schlupfrate um 1,4% (E8+4h) bzw. 3,5% (E9+4h) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (n=5108).

Nach dem Schlupf wurden während der 17-wöchigen Aufzuchtperiode Mortalität und Gewichtszunahmen von 150 Versuchs- und 80 Kontrolltieren überprüft. Zudem erfolgt von Lebenswoche 18 bis 60 eine noch andauernde Erhebung der Legeleistungsparameter (Eigewicht, Körpergewicht der Hennen, Futterverbrauch, Befiederung) bei 180 Hennen in Bodenhaltung. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics Version 20 (IBM, USA). Während der Aufzuchtperiode zeigten sich hinsichtlich des Körpergewichtes signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in Woche 4 und 6, wobei die Zunahmen in

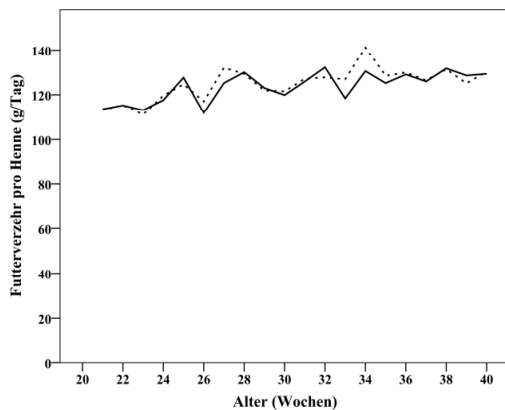


Abb. 1: Futterverzehr pro Henne (g/Tag) in der Versuchs- (---) und Kontrollgruppe (—).

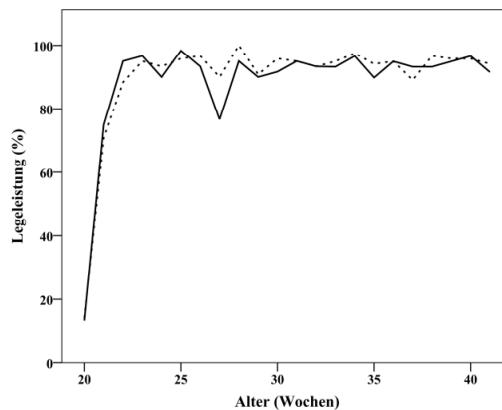


Abb. 2: Legeleistung (%) der Hennen aus der Versuchs- (---) und Kontrollgruppe (—).

der Versuchsgruppe geringer waren. Auffällig war, dass in Woche 6 fünf Tiere aus der Versuchsgruppe ein deutlich geringeres Körpergewicht (<400g) als die restlichen Tiere hatten. Die Uniformitäten betrugen in Lebenswoche (LW) 2, 4 und 6 für die Versuchsgruppe 85%, 72% und 66%, für die Kontrollgruppe 76%, 75% und 81%.

Erste Ergebnisse aus der Produktionsperiode weisen darauf hin, dass die Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bei den adulten Tieren vernachlässigbar sind. Bei der Futteraufnahme konnten zwischen LW 21 und 40 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p > 0,05$; Abb.1).

Das Körpergewicht der adulten Hennen wurde in LW 33 evaluiert und belief sich auf 1965 ± 127 g in der Versuchsgruppe und 1979 ± 140 g in der Kontrollgruppe; die Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Auch die Legeleistungskurven der Versuchs- und Kontrolltiere zeigten keine nennenswerten Abweichungen voneinander (Abb.2). Beide Gruppen begannen in LW 20 mit der Legetätigkeit; 50% Legeleistung wurde mit 145 Tagen erreicht. Eine maximale Legeleistung von $\geq 92\%$ erreichten die Versuchstiere an Tag 152, die Kontrolltiere an Tag 153. Die mittlere Legeleistung von Beginn der maximalen Legeleistung bis LW 40 betrug 93,5% (Versuchsgruppe) bzw. 93,3% (Kontrolle); die Unterschiede waren mit $p > 0,05$ nicht signifikant.

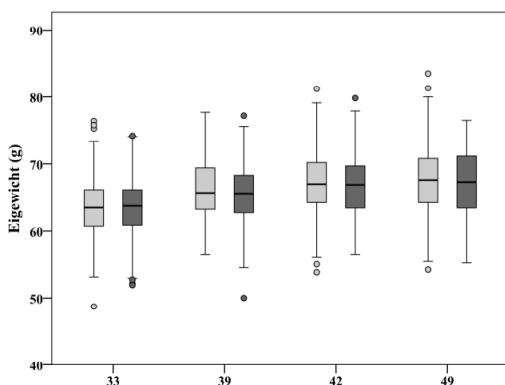


Abb. 3: Eigewicht (g) für Versuchs- (□) und Kontrolltiere (■) von Lebenswoche 33 bis 49.

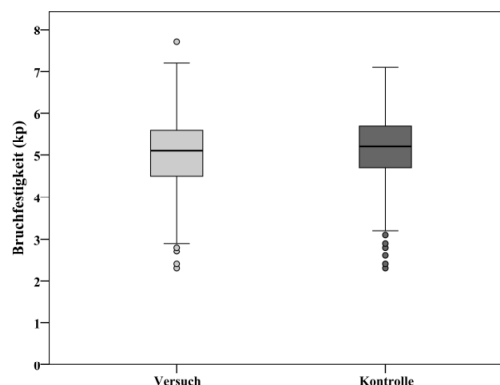


Abb. 4: Mittlere Bruchfestigkeit (kp) der Eischale für Eier von Versuchs- (□) und Kontrolltieren (■).

Das Eigewicht wurde im Alter von 33, 42, 39 und 49 Lebenswochen jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht (Abb.3). Das mittlere Eigewicht (Median (25. Perzentil; 75. Perzentil)) betrug 65,9g (62,8g; 69,3g) in der Versuchsgruppe und 65,8g (62,5g; 68,8g) in der Kontrollgruppe. Die weitere Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für die jeweilig untersuchten Zeitpunkte ($p>0,05$).

Als zusätzliches Kriterium für die Eiqualität wurde die Bruchfestigkeit der Eierschale an zwei verschiedenen Zeitpunkten (LW 39, LW 49) an jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen (Abb.4). Die erhobenen Werte unterschieden sich weder zwischen den Gruppen noch in Bezug auf das Alter der Tiere. Die mittlere Bruchfestigkeit über alle Messungen belief sich in der Versuchsgruppe auf 5,1 Kilopond (4,5kp; 5,6kp), in der Kontrollgruppe auf 5,2 kp (4,4kp; 5,7kp). Diese Ergebnisse zeigen, dass die beschriebene Methode eine verlässliche *in ovo*-Geschlechtsbestimmung an E9+4h der Inkubation erlaubt. Des Weiteren sind die Auswirkungen auf Embryonalentwicklung und Schlupfrate gering. Die weiterführenden Untersuchungen konnten zeigen, dass auch die Beeinflussung adulter Tiere durch eine Beprobung während der Inkubation vernachlässigbar ist. Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren waren nur während der Aufzucht feststellbar; diese Abweichungen sind jedoch wahrscheinlich der geringen Gruppengröße geschuldet. In Bezug auf Futterverzehr, Körpergewicht, Legeleistung und Eiqualität konnten keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren ermittelt werden. Demnach erfüllt die vorgestellte Methodik alle Grundvoraussetzungen für eine industrielle Anwendung. Da die Geschlechtsbestimmung zudem vor Einsetzen des embryonalen Schmerzempfindens erfolgt, kann sie als Basis für eine ethisch vertretbare Alternative zum Töten männlicher Eintagsküken dienen.

Danksagung

Dieses Projekt wurde von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), FKZ Nr. 511–06.01–28–1–33.025–07 (Projektkoordination Prof. Dr. M.-E. Krautwald Junghanns), und der Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) gefördert. Für die technische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung möchten wir uns bei Frau Stefanie Trinkies, Frau Ana Blanco, Frau Vicki Bachner und Frau Susanne Tätzner herzlich bedanken.

Literatur

- [1] Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest Prod Sci* 1998;56(1):15–33.
- [2] Ellendorff F, Klein S. Current knowledge on sex determination and sex diagnosis: potential solutions. *Worlds Poult Sci J* 2003;59(1):7.
- [3] Kaleta E, Redmann T. Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *Worlds Poult Sci J* 2008;64(03).
- [4] Ort J. Zur Tötung unerwünschter neonater und juveniler Tiere. *NuR* 2010;32(12):853–61.
- [5] Hirt A, Maisack C, Moritz J. Tierschutzgesetz: Kommentar, Vahlens Kommentare. München. Vahlen; 2003.
- [6] Icken W, Schmutz M, Caverio D, Preisinger R. Dual purpose chickens: The breeder's answer to the culling of day-old male layers. In: 9th European Symposium on Poultry Welfare: Book of Abstracts; 2013. p. 91 .
- [7] Gerken M, Jaenecke D, Kreuzer M, Martin DG. Growth, behaviour and carcass characteristics of egg-type cockerels compared to male broilers. *Worlds Poult Sci J* 2003;59(1):46–9.
- [8] Koenig M, Hahn G, Damme K, Schmutz M. Utilization of laying-type cockerels as "coquelets": Influence of genotype and diet characteristics on growth performance and carcass composition. *Arch Geflügelk* 2012;76(3):197–202.
- [9] Liebich H. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer GmbH; 2010.

- [10] Hutchison N. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. The Journal of Cell Biology 1987;105(4):1493–500.
- [11] Tiersch TR. Identification of sex in chicken by flow cytometry. Worlds Poult Sci J 2003;59:25–32.
- [12] Steiner G, Bartels T, Stelling A, Krautwald-Junghanns M, Fuhrmann H, Sablinskas V et al. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. Anal Bioanal Chem 2011;400(9):2775–82.
- [13] Klein S, Ellendorff F. Localisation of XhoI repetitive sequences on autosomes in addition to the W chromosome in chickens and its relevance for sex diagnosis. Animal Genetics 2000;31(2):104–9.
- [14] Arnold KE, Orr KJ, Griffiths R. Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. Mol Ecol 2003;12(12):3451–8.
- [15] Dutton CJ, Tieber A. A modified protocol for sex identification of in ovo avian embryos and its application as a management tool for endangered species conservation programs. J Anim Sci 2001;32(2):176–80.
- [16] Jensen T, Mace M, Durrant B. Sexing of mid-incubation avian embryos as a management tool for zoological breeding programs. Zoo Biol 2011;30:1–11.
- [17] Phelps P, Bhutada A, Bryan S, Chalker A, Ferrell B, Neuman S et al. Automated identification of male layer chicks prior to hatch. Worlds Poult Sci J 2003;59(1):33–8.
- [18] Tran HT, Ferrell W, Butt TR. An estrogen sensor for poultry sex sorting. J Anim Sci 2010;88(4):1358–64.
- [19] Woods JE, Brazzill DM. Plasma 17-Beta-Estradiol Levels in the Chick-Embryo. Gen Comp Endocrinol 1981;44(1):37–43.
- [20] Woods JE, Simpson RM, Moore PL. Plasma testosterone levels in the chick embryo. Gen Comp Endocrinol 1975;27(4):543–7.
- [21] Freeman BM, Vince MA. Development of the avian embryo: A behavioural and physiological study. London, New York. Chapman and Hall; Wiley; 1974.
- [22] Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. Lab Anim 1997;31(1):1–32.
- [23] Mellor DJ, Diesch TJ. Onset of sentience: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. Sentience in Animals 2006;100(1–2):48–57.
- [24] Mellor DJ, Diesch TJ. Birth and hatching: key events in the onset of awareness in the lamb and chick. N Z Vet J 2007;55(2):51–60.
- [25] Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. Theriogenology 2013;80:199–205.
- [26] Weissmann A, Förster A, Gottschalk J, Reitemeier S, Krautwald-Junghanns M-E, Preisinger R, Einspanier A. A large scale trial for *in ovo*-sexing in layers and its effects on hatchability and performance. Zur Publikation eingereicht am 11.11.2013.

Korrespondierender Autor:

Prof. Dr. Almuth Einspanier
 Veterinär Physiologisch-Chemisches Institut
 An den Tierkliniken 1
 04103 Leipzig
 Email: einspanier@vetmed.uni-leipzig.de

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Almuth Einspanier für die Überlassung des interessanten Themas, ihre stetige Unterstützung während der gesamten Promotion sowie die konstruktive Durchsicht der Manuskripte.

Für die Finanzierung dieser Arbeit danke ich der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (FKZ 511-06.01-28-1-33.010-07 und 511-06.01-28-1-33.025-07). Auch der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven gilt mein Dank für die Förderung des Projektes. Für die Koordination des Gesamtprojekts möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns bedanken.

Für die große Unterstützung während des zweiten Arbeitsabschnittes, die aufmerksame Durchsicht der gemeinsamen Manuskripte und die Beantwortung der vielen fachlichen Fragen bedanke ich mich bei Frau Dr. Anke Förster.

Bei allen Mitarbeitern der Brüterei Altenwalde, insbesondere Frau Stefanie Trinkies, möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenentnahme und das Sortieren der unzähligen Eier bedanken. Auch Frau Vicki Bachner, Frau Ana Blanco und Frau Djanet Ould-Ali gilt mein Dank für ihre große Hilfe bei der Probenentnahme während der Großversuche.

Für die vielen netten gemeinsam im Labor verbrachten Stunden beim Pipettieren von Assays möchte ich mich herzlich bei Frau Susanne Tätzner bedanken.

Frau Dr. Jutta Gottschalk möchte ich für ihre große Hilfe bei Fragen und Problemen im Labor sowie die geduldige und aufmerksame Kontrolle sämtlicher Probenlisten danken.

Frau Dr. Anke Hahn gilt mein Dank für die nette Einarbeitung in die Welt der Assays und die Kunst der Eierbeobachtung.

Für ihre Hilfe bei den Versuchen, die kritische Durchsicht sämtlicher Manuskripte, die vielen Tipps bezüglich Formatierung & Co sowie nicht zuletzt die nette Atmosphäre im gemeinsamen Büro möchte ich mich bei Frau Susanne Reitemeier bedanken.

Für ihre Hilfe bei der Verdünnung ungezählter Allantoisproben und der Beschriftung doppelt so vieler Eppis bedanke ich mich bei Herrn Robert Nestler, Frau Christin Meinhardt, Frau Alexandra Holzner, Herrn Richard Utsch und Herrn Matthias Mietsch.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit von Studium und Promotion unterstützt und ermutigt haben. Auch bei meinen Freunden, insbesondere Maria Schober, möchte ich mich für die vielen fachlichen Diskussionen und nicht zu Letzt die erforderliche Ablenkung zwischendurch bedanken.